

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Februar 2003 (27.02.2003)

PCT

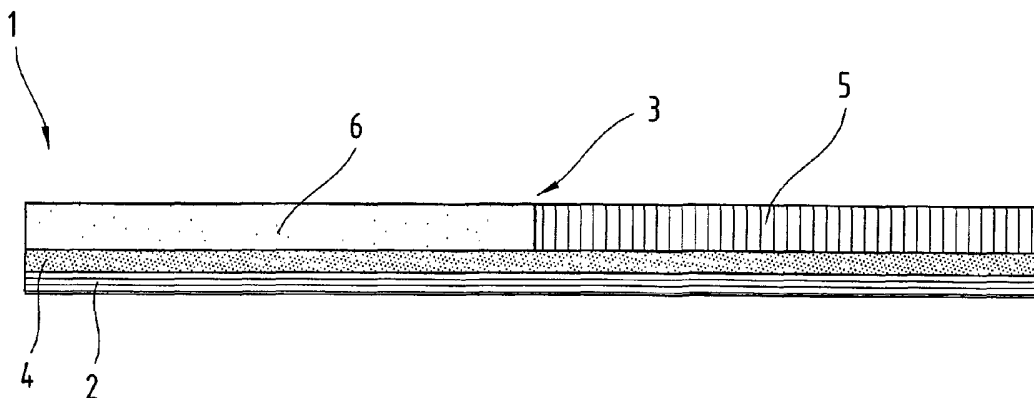
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/016903 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/53 (74) **Anwalt:** SECKLEHNER, Günter; Rosenaueurweg 268, A-4580 Windischgarsten (AT).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT02/00246 (81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT (Gebrauchsmuster), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (Gebrauchsmuster), CZ, DE (Gebrauchsmuster), DE, DK (Gebrauchsmuster), DK, DM, DZ, EC, EE (Gebrauchsmuster), EE, ES, FI (Gebrauchsmuster), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (Gebrauchsmuster), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
16. August 2002 (16.08.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
GM 652/2001 20. August 2001 (20.08.2001) AT
A 963/2002 27. Juni 2002 (27.06.2002) AT
- (71) Anmelder und
(72) **Erfinder:** PILS, Walter [AT/AT]; Linzerstrasse 5, A-4223 Katsdorf (AT).
- (72) **Erfinder; und**
(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US):** PILS, Dietmar [AT/AT]; Pernnerstorfergasse 13/2/13, A-1100 Wien (AT).
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** DEVICE AND METHOD FOR DETERMINING AN ANALYTE

(54) **Bezeichnung:** VORRICHTUNG UND VERFAHREN YUM NACHWEIS EINES ANALYTEN



(57) **Abstract:** The invention relates to a method for determining at least one analyte from a sample by an immunochemical reaction with a device consisting of several zones. Said at least one analyte is applied on a starting zone in a reagent, especially an organic reagent, and flows into at least one other zone with one or several fields under the effect of capillary forces, whereby at least one specific binding partner, to which at least one substance is conjugated, is temporarily immobilized in a field.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis zumindest eines Analyten aus einer Probe durch eine immunochemische Reaktion mit einer Vorrichtung bestehend aus mehreren Zonen. Der zumindest eine Analyt wird in einem Reagens, insbesondere einem organischen Reagens, auf eine startzone aufgebracht und läuft durch Kapillarkräfte in zumindest eine weitere Zone mit einem oder mehreren Feldern, wobei in einem Feld zumindest ein spezifischer Bindungspartner, an welchen zumindest eine Substanz konjugiert ist, temporär immobilisiert ist.



WO 03/016903 A2



Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Vorrichtung und Verfahren zum Nachweis eines Analyten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis zumindest eines Analyten aus einer Probe durch eine immunochemische Reaktion mit einer Vorrichtung bestehend aus mehreren Zonen.

5 Weiters betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zum Nachweis zumindest eines Analyten aus einem oder mehreren kapillarfähiges Materialien, auf denen zumindest eine Startzone und eine angrenzende Zone bestehend aus einem oder mehreren Feldern in dem oder denen zu-
mindest ein immobilisiertes Reagens angeordnet ist. Des weiteren betrifft die Erfindung ein
10 Reagens zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17 und einen Analysekit nach Anspruch 57. Die Erfindung betrifft ebenso die Verwendung der Vorrichtung, des Reagens sowie des Analysekits entsprechend den Ansprüchen 58 bis 60.

Durch den zusehends größer werdenden Mißbrauch von Arzneimitteln und Drogen besteht immer mehr die Notwendigkeit diese im Menschen nachzuweisen um eine Beeinträchtigung
15 z.B. seiner Reaktionsfähigkeit während der Arbeitszeit oder im Straßenverkehr ausschließen zu können. Die Bestimmung und Quantifizierung von Analyten, insbesondere von illegalen Substanzen, in biologischen Proben, wie z.B. Blut und Urin, ist eine nützliche analytische Methode um den Mißbrauch von Drogen zu verifizieren. Zur Zeit ist es üblich, Drogen bzw. Drogenderivate im Blut, Serum, Plasma bzw. im Urin nachzuweisen. Durch die aufwendige
20 Probengewinnung, wie z.B. von Blut, welches nur von medizinischem Fachpersonal gewonnen werden darf, ist der Nachweis nur in Speziallabors möglich und somit mit einem großen Aufwand verbunden. Durch die aufwendigen Analyseverfahren kommt es auch häufig zu großen Zeitverzögerungen bis ein endgültiges Ergebnis vorliegt.

25 Der Nachweis von illegalen Substanzen aus dem Urin bietet eine Alternative. Allerdings korrespondieren die nachgewiesenen Mengen von Drogen bzw. Drogensatzstoffen aus positiven Urintests nicht eindeutig mit jenen Konzentration, welche im Blut nachgewiesen werden, da diese Stoffe teilweise noch Tage nach deren Konsum im Urin nachweisbar sind, aber nicht mehr im Blut vorhanden sind und daher zum Zeitpunkt der Urinabgabe keine drogenspezifischen Beeinträchtigung des Probanden mehr vorliegt.
30

Zur Bestimmung des gegenwärtigen Zustands einer Person sind also nur Analysen, welche die Drogenkonzentrationen aus dem Blut bestimmen zweckdienlich. Allerdings korreliert die Konzentration von illegalen Substanzen im Blut sehr gut mit jener des Speichels. Zum Nach-
35 weis von Drogen bzw. Drogensatzstoffen aus dem Speichel müssen allerdings sehr sensitive

Tests verwendet werden, weil im Speichel teilweise nur geringere Konzentrationen dieser Stoffe als im Blut vorhanden sind. Zielführend ist es daher eine Analyse anzuführen, welche den Nachweis von illegalen Substanzen aus dem Speichel ermöglicht.

5 In der DE 196 22 503 A1 wird ein Verfahren zum Nachweis von Analyten auf Oberflächen, die mit Körperflüssigkeiten in Berührung gekommen sind, beschrieben. In diesem Dokument wird ein Teststreifen aus einem oder mehreren kapillaraktiven chromatographiefähigen flächenförmigen Materialien in Fluidkontakt zueinander mit einer Elutionsmittelaufgabezone an einem Ende und einer Zielzone am anderen Ende beschrieben. Zwischen der Elutionsmittelaufgabezone und der Zielzone befindet sich eine Abfangzone, in der ein Abfangreagens immobilisiert ist. Das Abfangreagens kann entweder den Analyten, einen spezifischen Analytbindungspartner oder einen markierten Bindungspartner binden. Zwischen der Elutionsmittelaufgabezone und der Abfangzone befindet sich noch eine Konjugatzone, die einen wandlungsfähigen markierten Bindungspartner enthält. Der Bindungspartner kann entweder den
10 Analyten oder den spezifischen Analytbindungspartner oder das Abfangreagens spezifisch binden, wobei die Bindung des markierten Bindungspartners zu einem detekierbaren Signal in der Abfangzone oder in der Zielzone führt. Dieses Signal zeigt die Anwesenheit des Analyten an. Weiters wird ein Wischelement separat zur Teststreifenoberfläche und eine Andrückvorrichtung, die einen Kontakt zwischen dem Wischelement mit der Teststreifenoberfläche zwischen Elutionsmittelauftragszone und Konjugatzone eliminiert. Mit dem Wischelement werden Körperflüssigkeiten von einer Körperregion aufgenommen. Als Markierungen zur Detektion kommen bevorzugt Direktmarkierungen, wie Metallmarkierungen, insbesondere die Goldmarkierung in Frage, weil direkt mit dem Auge das Testergebnis abgelesen werden kann.
15 Als Bindungspartner für den Analyten kommen Antikörper und Antikörperfragmente in Betracht. Mit diesem Verfahren können Absolutmengen von bis zu 10 ng Analyt, insbesondere Drogen auf Oberflächen, nachgewiesen werden. Nachteilig an dieser Offenbarung ist, daß geringe Konzentrationen von Analyten nicht nachgewiesen werden können.

30 In der US 6 248 598 B1 wird eine Methode, welche einerseits zur Gewinnung von Speichel und andererseits zur Detektion von mindestens einem Analyten darin ohne zusätzlich externe Reagenzien zufügen zu müssen, beschrieben. Durch die Bestimmung von Drogen aus dem Speichel kann auch ein kurzfristiger Konsum dieser nachgewiesen werden. Die US B1 beschreibt eine Methode zur Detektion eines Analyten mit einer Vorrichtung die einen ersten Teil mit absorbierendem Material, der Speichel im Mund absorbiert, mit einem zweiten Teil
35 in fluide Verbindung bringt und anschließend eine visuelle Detektion von Analyten ermög-

licht. Auf diesem zweiten Teil ist ein Ligand der spezifisch einen Analyten bindet, ein Indikator, der aus einem Analyten mit einer visuell detektierbaren Markierung besteht, ein Bereich auf dem die Gegenwart oder Abwesenheit des Analyten angezeigt wird und eventuell ein Kontrollbereich angeordnet. Weiters ist eine Halterung, in welcher sich ein Fenster zur visuellen Detektion befindet, beschrieben. Das eine Ende der Vorrichtung wird für 10 bis
5 120 sec. in den Mund zur Anreicherung von Speichel gegeben, wieder entfernt und innerhalb von 1 bis 60 min. nach der Speichelgewinnung kann die Gegenwart bzw. Abwesenheit des Analyten visuell angezeigt werden.

10 Die WO 00/208 62 A1 beschreibt ein Verfahren und einen Apparat zur in vitro Detektion von vielen verschiedenen Analyten, aus Serum, Plasma, Blut, Speichel oder Urin menschlichen oder tierischen Ursprungs. Das Detektionssystem besteht aus einer Plastikvorrichtung mit einem absorbierenden Kissen mit einer Affinitätsmembran. Die Vorrichtung hat spezifische Regionen auf der Membran, in welcher Antigene immobilisiert sind. Jede Vorrichtung besitzt
15 eine Kontrollsubstanz zur Qualitätskontrolle, um zu überprüfen, ob die Vorrichtung korrekt funktioniert. Im Falle der Antikörperdetektion ist das Kontrollmaterial normalerweise humanes IgG. Im Falle von Antigenetektionen ist das Kontrollmaterial ein spezifisches Antigen. In einem Multianalytdetektionssystem kann jeder beliebige Bereiche als Kontrollbereich verwendet werden. Die Vorrichtung besteht aus einer mikroporösen Membran mit einer ersten
20 und einer zweiten Oberfläche, wobei eine Flüssigkeit von einer Seite zur anderen fließt. Die Membran weist eine Vielzahl von lesbaren Bereichen, die voneinander beabstandet über die gesamte Membran angeordnet sind, wobei auf jeden Bereich ein Antigen, Antikörper oder Hapten immobilisiert ist, auf. Weiters hat die Vorrichtung eine Abdeckung für die erste Seite der Membran mit einer Vertiefung für die Aufnahme von Flüssigkeiten, wodurch ein Bereich
25 der Membran sichtbar wird. Zuletzt besteht die Vorrichtung noch aus einem absorbierenden Material, welches in Kontakt mit der zweiten Seite der Membran steht, für die Aufnahme der Flüssigkeit, welche durch die Membran diffundiert ist. Weiters wird auch eine Methode zur Detektion mit dieser Vorrichtung beschrieben.

30 Nachteilig an diesen Verfahren und diesen Vorrichtungen ist, daß die Nachweisgrenzen von 10 ng für die jeweilige Droge bzw. für den Drogenersatzstoff nicht unterschritten werden kann. Besonders nachteilig dabei erweist sich, daß sich gerade im Speichel, welcher sehr leicht gewinnbar ist, oft nur geringe Konzentrationen von illegalen Substanzen befinden.

35 Aufgabe der Erfindung ist es daher Möglichkeiten zum Nachweis von geringen Konzentrationen

nen von verschiedenen Analyten zur Verfügung zu stellen. Es ist weiters eine Teilaufgabe der Erfindung die Spezifität zum Nachweis von Drogen sowie Drogenersatzstoffen zu steigern.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch das Verfahren entsprechend den Merkmalen im Kenn-
5 zeichenteil des Anspruchs 1 gelöst. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß bereits sehr niedrige Konzentrationen eines Analyten ausreichen, um mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen werden zu können. Dieses Verfahren bietet somit eine höchst sensitive Methode, um Analyten aus einer Probe nachzuweisen. Einfache Nachweisverfahren zur Bestimmung von Analyten erlauben es, diese außerhalb von Labors durchführen zu können,
10 wie z.B. auf der Straße, in Polizeistationen, in Gefängnissen, in Fabriken oder anderen Arbeitsplätzen, zu Hause, praktisch an jedem Ort. Dieses Nachweisverfahren eliminiert die Notwendigkeit von kostenintensiven Laboranalysen und ermöglicht somit eine Kostenersparnis.

Vorteilhaft erweist sich weiters nach Anspruch 2, daß durch die Substanz, welche an den spezifischen Bindungspartner gebunden ist, die Sensitivität dieses Nachweisverfahrens durch die
15 zusätzliche chemische Reaktion, welche durch die Substanz verursacht wird, erheblich erhöht werden kann.

Weiters erweist sich eine Weiterbildung des Verfahrens nach Anspruch 3 als vorteilhaft, weil
20 unphysiologische Substrate beispielsweise für Enzyme, wie z. B. β -Galactosidase, Horseradishperoxidase, etc. nach der chemischen Reaktion farbige Reaktionsprodukte ergeben und erlauben somit eine visuelle und auch spektrophotometrische Detektion. Bei den Proteinen Streptavidin, Avidin bzw. Protein A erweisen sich die multiplen Bindungsstellen für Biotin bzw. Fc Teile von Antikörpern als vorteilhaft. Beispielsweise kann ein Antikörper mit Biotin
25 markiert sein. Proteine wie Streptavidin und Avidin binden mit einer ihrer vier Bindungsstellen hochspezifisch an Biotin. Freie Biotin-Bindungsstellen werden dann mit einem biotinmarkiertem Enzym z.B. alkalische Phosphatase, abgesättigt. Durch die Zugabe von chromogenen Substraten fällt ein Farbgemisch aus, wodurch die Bindung nachgewiesen werden kann. Da die biotinbindenden Proteine vier Biotin-Bindestellen enthalten und die verwendeten Enzyme
30 ebenfalls mehrere Biotin-Gruppen tragen, können sich Komplexe mit vielen Protein-Enzym-Biotin-Molekülen ausbilden, wodurch die Nachweisempfindlichkeit wesentlich erhöht wird. Alkalische Phosphatase wird als Markerenzym eingesetzt, da sich in Verbindung mit geeigneten Substraten ein empfindliches, histochemisches Farbreagens und Signalverstärkersystem entwickelt. Das Enzym β -Galactosidase spaltet natürliche wie künstliche β -D-Galactoside in
35 Galactose und die entsprechenden Reste (meist Alkohol-Verbindungen). Unphysiologische

Substrate für das Enzym, wie ONPG oder X-gal ergeben nach der Hydrolyse und Oxidation farbige Reaktionsprodukte und erlauben somit eine visuelle und auch spektrophotometrische Detektion.

5 Vorteilhaft ist weiters eine Ausgestaltung nach Anspruch 4, wobei durch die Auftrennung des Analyten in den vielen Zonen sowohl eine Reaktion mit einer Farbstoffkomponente bzw. deren Vorstufe als auch mit einem konjugierten Antikörper erfolgen kann und diese dann in einem Analysefeld detektiert werden können. Von Vorteil ist weiters, wonach unabhängig vom Vorhandensein eines Analyten in der Probe eine Markierung in der Zone des Kontrollfeldes detektierbar wird, um die Funktionsfähigkeit des Analyseverfahrens zu kontrollieren. 10 Weiters erweist sich als vorteilhaft, daß durch die Anordnung mehrerer Analysefelder gleichzeitig verschiedene Analyten nachgewiesen werden können. Einen weiteren Vorteil stellt die temporäre Immobilisierung der Reagenzien im Farbstofffeld und im Konjugatfeld dar, weil sich dadurch die Zugabe dieser Reagenzien während der Analyse erübrigt und somit das Ver- 15 fahren vereinfacht wird und eine Verwechslung der Reagenzien ausgeschlossen werden kann. Durch die Anordnung von Lauffeldern wird ermöglicht, daß die Analyten während der Passage des kapillarfähigen Materials von partikulären Verunreinigungen befreit werden.

Dabei erweist sich eine Ausgestaltung nach Anspruch 5 vorteilhaft, wonach durch dieses Ver- 20 fahren eine Vielzahl von Analyten nachgewiesen werden kann. Als vorteilhaft erweist sich weiters, daß mit dem gleichen Verfahren eine so große Anzahl von Analyten nachgewiesen werden kann ohne das Verfahren anpassen zu müssen. Weiters ist von Vorteil, daß durch die Vielfältigkeit dieses Verfahrens keine spezielle Einschulung des durchzuführenden Personals für die verschiedenen Analyten erforderlich ist und somit eine Vielzahl von Analyten von nur 25 einer Person ausgewertet werden kann. Als Vorteilhaft erweist sich weiters, daß mehrere Analyten mittels eines Verfahrens und auf einer Vorrichtung gleichzeitig ausgewertet werden können.

Von Vorteil sind die Weiterbildungen nach den Ansprüchen 6, 7, 8 und 9, wonach insbeson- 30 dere Analyten, welche das physiologische Gleichgewicht des Menschen beeinflussen, nachgewiesen werden können. Als vorteilhaft dabei erweist sich, daß das Verfahren eine einfache Handhabung gewährleistet und somit von jedermann durchgeführt werden kann. Durch dieses multipel anwendbare Verfahren wird eine Kostenminimierung für die Analyse der unter- 35 schiedlichsten Analyten erzielt. Die Analyten können direkt vor Ort bestimmt werden und müssen nicht erst in ein Speziallabor transportiert werden. Durch das rasche Testergebnis

kann des weiteren frühzeitig entschieden werden, ob eine Beeinträchtigung des Individuums durch den Analyten vorliegt und somit weitere gefährliche Situationen vermieden werden können. Ein rasches Testergebnis verhindert des weiteren auch die Möglichkeit der Manipulation von biologischen Proben wie beispielsweise durch die Einnahme von Doping-Maskierern, wie z.B. Probenecid den Nachweis von Steroid-Hormonen verhindert. Durch das sofortige Vorliegen eines Ergebnisse vor Ort wird die Argumentation für den Probanden viel schwieriger. Es könnte dadurch verhindert werden, daß z.B. Sportler eine olympische Medaille bekommen, obwohl sie ihnen nicht zusteht, aber man allerdings bis zu einigen Tagen nach der Siegerehrung warten muß, bis ein endgültiges Ergebnis der Dopingkontrolle mit herkömmlichen Tests vorliegt.

Sowohl Drogen als auch Psychopharmaka beeinträchtigen einerseits die Reaktionsfähigkeit der Probanden am Arbeitsplatz und andererseits deren Verkehrstüchtigkeit im Straßenverkehr. Durch das Vorliegen eines raschen Testergebnisses mittels dieses Verfahrens kann die unmittelbare Gefahr von solchen Situationen sofort erkannt werden.

Vorteilhaft ist weiters eine Weiterbildung des Verfahrens nach Anspruch 10, wonach durch den raschen Nachweis von Antikörpern gegen Infektionen das Risiko für Kontaminationen für das Personal, welche die Analyse durchführt, minimiert werden kann. Einerseits kann durch den Nachweis einer viralen Infektion entschieden werden, daß für die weiteren Untersuchungsmaßnahmen besondere Vorsicht vorherrschen soll. Andererseits kann durch das Vorliegen von raschen Analyseergebnissen auf eine intensive Behandlung vermeintlich infizierter Personen oder gar deren Quarantäne verzichtet werden.

Gemäß Anspruch 11 ermöglicht das Verfahren einen Nachweis von verschiedenen Hormonen, wie z.B. von HCG, welches nur während der Schwangerschaft nachweisbar ist. Somit wird durch dieses Verfahren auch eine einfache Möglichkeit zum raschen Nachweis einer Schwangerschaft möglich.

Vorteilhaft erweist sich auch eine Weiterbildung des Verfahrens nach Anspruch 12, wonach bei auffälliger Anamnese bereits rasch eine erste Aussage über das Vorhandensein von Tumormarkern getroffen werden kann, und somit die Zeitspanne, bis zum Ergebnis des Befundes und somit die Ungewißheit für den Patienten minimiert wird.

Weiters erweist sich die Ausgestaltung des Verfahrens nach Anspruch 13 von Vorteil, wobei

durch den Nachweis des Toxins sofort mit der richtigen Behandlung der Intoxikation begonnen werden kann und beispielsweise sofort das passende Antidot verabreicht werden kann.

5 Von Vorteil ist eine Weiterbildung nach Anspruch 14, 15 und 16, wonach der Analyt aus einer Probe beliebigen Ursprungs stammen und für das Verfahren eingesetzt werden kann. Besonders von Vorteil ist bei diesem Verfahren, daß trotz der Vielfalt der Proben unabhängig von ihrem Ursprung immer ein sicheres, reproduzierbares Ergebnis erzielt wird. Besonders vorteilhaft erweist sich dabei, daß das Verfahren eine hohe Toleranzgrenze gegenüber Kontaminationen aufweist und die Proben daher vor der Analyse nicht aufgereinigt werden müssen.
10

Von Vorteil zeigt sich auch die Weiterbildung des Verfahrens nach Anspruch 17, wonach bereits sehr geringe Mengen eines Analyten nachgewiesen werden können. Die hohe Sensitivität des Verfahrens ermöglicht somit die Detektion von Analyten im Pikogrammbereich.
15

Die Aufgabe der Erfindung wird eigenständig auch durch eine Vorrichtung entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil des Anspruches 18 gelöst. Vorteilhaft daran ist einerseits, daß mittels dieser Vorrichtung eine sehr sensitive Möglichkeit zum Nachweis zumindest eines Analyten zur Verfügung steht. Andererseits ist von Vorteil, daß durch den einfachen Aufbau
20 der Vorrichtung, diese sowohl von chemisch als auch medizinisch ungeschultem Personal bedient und ausgewertet werden kann und somit der Nachweis des Analyten unabhängig von einem bestimmten Ort durchgeführt werden kann.

Eine Weiterbildung nach Anspruch 19 erweist sich als vorteilhaft, weil dadurch unspezifische Bindungen verhindert werden können und somit nur spezifische Bindungen stattfinden können und auch detektiert werden können. Weiters ist von Vorteil, daß während der Detektion keine Signale, welche aus unspezifischen Bindungen resultieren, die Ablesbarkeit der Vorrichtung beeinflussen.
25

Gemäß der Ausgestaltung nach Anspruch 20 wird die Sensitivität der Vorrichtung zum Nachweis des Analyten erhöht. Die Farbstoffkomponenten und deren Vorstufen wirken als Teil eines Verstärkersystems. Weiters erweist sich als vorteilhaft, daß durch das Anbringen eines Farbstofffeldes ermöglicht wird, daß nur der Analyt auf die Vorrichtung aufgebracht werden muß und nicht erst die Farbstoffkomponenten dem Reagens zugefügt werden müssen. Somit
35 wird die Handhabung der Vorrichtung wiederum vereinfacht.

Weiters erweist sich nach Anspruch 21 von Vorteil, daß durch die Anordnung eines Kontrollfeldes eine Kontrolle des gesamten Nachweisverfahrens durchführbar ist. Unabhängig von der Gegenwart eines Analyten in der Probe wird ein Signal detektiert und somit eine Funktionskontrolle für die Analyse ermöglicht. Vorteilhaft ist weiters, daß in der Analysezone nicht nur
5 der Analyt selbst, sondern auch ein spezifischer Bindungspartner für diesen immobilisiert werden kann und somit eine große Anzahl von Bindungspartnern für die Bindung des Analyten aus der Probe zur Verfügung stehen. Vorteilhaft erweist sich auch, daß eine große Anzahl von verschiedenen Analyten mit einer Vorrichtung analysiert werden kann. Durch die Anordnung eines Konjugat- und Farbstofffeldes erübrigt sich das Beimengen der Stoffe, welche an
10 diesen Feldern temporär immobilisiert sind und somit die Fehleranfälligkeit des Tests minimiert wird. Weiters erweist sich von Vorteil, daß sich sowohl in der Kontrollzone als auch in der Analysezone entweder der spezifische Bindungspartner, an welche die gleiche Substanz konjugiert ist oder die gleiche Substanz selbst, welche die gleiche Reaktion mit dem Farbstoff bzw. den Farbstoffvorstufen erzeugt, befinden. Dadurch wird eine genaue Kontrolle der
15 Funktionsfähigkeit der Vorrichtung ermöglicht.

Gemäß der Weiterbildung der Vorrichtung nach Anspruch 22 ist von Vorteil, daß spezifische Bindungsstellen des zumindest einen Analyten nicht durch unspezifische Reaktionen der Farbstoffkomponenten bzw. deren Vorstufen bereits im Vorfeld der Analyse blockiert werden
20 und somit zu einem falsch negativen Ergebnis führen würden.

Vorteilhaft sind auch Ausbildungen der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 23 und 24, wobei die Farbstoffkomponente bzw. deren Vorstufen als Verstärkersystem dienen und die Sensitivität der Analyse somit gesteigert wird. X-gal hat gegenüber ONPG den Vorteil, daß
25 der nach der Hydrolyse und Oxidation als Reaktionsprodukt entstehende, blaue Indigofarbstoff schwer löslich ist und somit nicht diffundiert.

Von Vorteil erweisen sich auch Ausgestaltungen nach den Ansprüchen 25 und 26, wonach durch die Zugabe dieser Stoffe, eine bessere Löslichkeit der Farbstoffkomponenten und deren
30 Vorstufen erzielt und somit wiederum die Sensitivität der Analyse verbessert wird.

Die Weiterbildung nach Anspruch 27 erweist sich als vorteilhaft, wonach eine Kontrolle der Analyse ermöglicht wird, weil in jedem Fall eine Bindung der Substanzen an die im Kontrollfeld vorhandenen spezifischen Bindungspartner stattfindet und somit die Funktionalität der
35 Analyse auf jeder Vorrichtung oder auf einer eigenen Vorrichtung kontrolliert werden kann.

Von Vorteil ist auch eine Ausgestaltung nach Anspruch 28 wobei bereits geringe Mengen an spezifischen Bindungspartnern für die Substanzen ausreichen um ein detektierbares Signal zu erhalten und somit die Herstellungskosten der Vorrichtung sehr niedrig gehalten werden können.

5

Gemäß der Ausgestaltung nach Anspruch 29 erweist sich von Vorteil, daß während der Analyse im Analysefeld in jedem Fall genügend Substanz konjugierte spezifische Bindungspartner vorhanden sind, weil das Kontrollfeld nachgeordnet angebracht ist und daher nicht bereits zu viele substanzspezifische Bindungspartner im Kontrollfeld abgefangen werden können und dadurch für das Analysefeld nicht mehr genügend spezifische Bindungspartner, welche an

10

eine Substanz konjugiert sind, zur Verfügung stehen würden.

Vorteilhaft erweisen sich auch die Weiterbildungen nach Anspruch 30, wobei im Analysefeld der gleiche Analyt angeordnet ist bzw. ein spezifischer Bindungspartner für den nachzuweisenden Analyten und somit Kreuzreaktionen und falsch positive Ergebnisse durch unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden können.

15

Von Vorteil ist auch eine Ausgestaltung nach Anspruch 31, daß eine Vielfalt von Analyten nachgewiesen werden kann und die Vorrichtung nicht nur für den Nachweis eines einzigen Analyten verwendet werden kann und dadurch Produktionskosten für die unterschiedlichen Ausgestaltungen der Vorrichtungen minimiert werden können. Von Vorteil erweist sich weiters, daß das gleiche Verfahren für den Nachweis aller Analyten angewendet werden kann.

20

Weiters erweist sich eine Ausgestaltung nach Anspruch 32 von Vorteil, wonach nur eine geringe Menge des Analyten auf die Vorrichtung aufgebracht werden muß und dadurch die Kosten für den Materialaufwand der Vorrichtung minimiert werden.

25

Von Vorteil sind auch die Weiterbildungen der Vorrichtung nach den Ansprüchen 33 und 34, womit die Intensität der durch die Auswertung entstandenen Signale in diversen Abstufungen vorliegt, da eine zu hohe Konzentration eine Überlagerung der Signale verursachen würde, wodurch die Klarheit der Analyseergebnisse gefährdet ist. Damit kann die Vorrichtung unabhängig von der zu erwartenden Konzentration des Analyten universell angewandt werden. Weiters ist von Vorteil, daß die unterschiedlichen Konzentrationen der Analyten eine Quantifizierung ermöglichen.

30

35

Die Aufgabe der Erfindung wird eigenständig auch durch ein Reagens entsprechend den Merkmalen in Kennzeichenteil des Anspruches 35 gelöst. Es erweist sich von Vorteil, daß für die Herstellung des Reagens einfache chemische Verbindungen verwendet werden können, die in der Herstellung und Beschaffung sehr niedrige Kosten verursachen und somit in der Folge eine kosteneffiziente Herstellung des Reagens ermöglichen. Vorteilhaft daran ist auch, daß eine Intensivierung des Signals hervorgerufen werden kann und somit die Sensibilität des Verfahrens und auch der Vorrichtung steigt.

Gemäß der Weiterbildung des Reagens nach Anspruch 36 erweist sich von Vorteil, daß der Analyt bereits im Reagens gebunden werden kann und im Analyseverfahren durch einen spezifischen Bindungspartner für den Bindungspartner des Analyten nachgewiesen wird. Es besteht dadurch eine Möglichkeit einen indirekten Nachweis des Analyten zu ermöglichen.

Gemäß den Weiterbildungen des Reagens nach den Ansprüchen 37 bis 39 können dem Reagens bereits Komponenten des Farbstoffsystems oder deren Vorstufen beigemischt sein und dadurch kann man beispielsweise die Laufstrecke des Analyten auf der Vorrichtung verkürzen und somit die Größe der Vorrichtung insgesamt minimieren.

Von Vorteil erweisen sich weiters die Weiterbildungen nach den Ansprüchen 40 und 41, wonach durch die Zugabe dieser Komponenten eine raschere Löslichkeit der Farbstoffkomponenten in dem Reagens erreicht wird und/oder die Adsorption der Farbstoffkomponenten am kapillarfähigen Material der Vorrichtung vermindert wird.

Von Vorteil zeigen sich auch die Weiterbildungen nach den Ansprüchen 42 bis 47, wonach für die Herstellung des Reagens Standardprodukte aus der chemischen Industrie verwendet werden können, und somit die Herstellungskosten für das Reagens niedrig gehalten werden.

Weiters erweisen sich die Weiterbildungen nach den Ansprüchen 48 bis 50 von Vorteil, wonach während der gesamten Analyse konstante Bedingungen im Reagens und somit ein reproduzierbares Ergebnis gewährleistet wird. Außerdem wird durch die Aufrechterhaltung von konstanten Bedingungen die Funktionalität der Vorrichtung verbessert. Von Vorteil dabei erweist sich insbesondere, daß durch den Zusatz einer Mischung der genannten Puffer es gelingt, das Reagens über einen größeren pH-Wert abzupuffern und die Nachweisreaktion des Analyten nicht gestört ist und somit auch bei Untersuchungen von verunreinigten Proben ein reproduzierbares Analyseergebnis zur Verfügung steht.

Gemäß den Ausbildungen nach einem der Ansprüche 51 und 52 erweist sich von Vorteil, daß für die Auflösung von Substanzen mit komplizierten Molekülstrukturen und auch großen Molekülen ein Detergens eine Verbesserung der Löslichkeit herbeiführt.

5 Weiters erweisen sich die Ausgestaltungen nach den Ansprüchen 53 und 54 als vorteilhaft, wonach durch das Zufügen dieser Substanzen sowohl die Osmolarität des Reagens als auch die Löslichkeit erhöht werden.

Von Vorteil sind auch Weiterbildungen nach den Ansprüchen 55 und 56, wonach die Halt-
10 barkeit des Reagens verlängert wird.

Die Aufgabe der Erfindung wird eigenständig auch durch einen Analysekit entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil des Anspruches 57 gelöst. Vorteilhaft daran ist, daß alle notwendigen Vorrichtungen und Reagenzien zur Durchführung der Analyse zur Verfügung ge-
15 stellt werden. Von Vorteil ist weiters, daß durch die einfache Aufbewahrungsart des Analysekits bei Raumtemperatur eine Lagerung unabhängig vom Ort möglich ist.

Die Aufgabe der Erfindung wird eigenständig auch durch die Verwendung der Vorrichtung entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil des Anspruches 58 gelöst. Von Vorteil er-
20 weist sich, daß durch die Verwendung der Vorrichtung ein probates Mittel zur Analyse zumindest eines Analyten in einer Probe zur Verfügung steht.

Die Aufgabe der Erfindung wird eigenständig auch durch die Verwendung des Reagens entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil des Anspruches 59 gelöst. Vorteilhaft erweist
25 sich, daß durch die Verwendung des Reagens ein kostengünstiges und mit Verstärkungspotential ausgestattetes Mittel zur Verfügung steht.

Die Aufgabe der Erfindung wird auch eigenständig durch die Verwendung des Analysekits entsprechend den Merkmalen im Kennzeichenteil des Anspruches 60 gelöst. Von Vorteil da-
30 bei erweist sich, daß durch die Verwendung des Analysekits eine rasche und unkomplizierte Analytbestimmung unabhängig vom Ort ermöglicht wird.

Zum besseren Verständnis der Erfindung wird diese anhand der nachfolgenden Figuren näher
erläutert, wobei diese in schematisch vereinfachter Darstellung eine Vorrichtung zum Nach-
35 weis zumindest eines Analyten zeigt. Die Erfindung wird im nachfolgenden anhand der in der

Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Es zeigen:

- 5 Fig. 1 eine viereckige Vorrichtung aus Startzone und Analysefeld;
- Fig. 2 eine viereckige Vorrichtung aus Startzone, Zone und Zielzone;
- Fig. 3 eine viereckige Vorrichtung aus Startzone, Zone und Zielzone;
- 10 Fig. 4 eine runde Vorrichtung aus Startzone und Analysefeld;
- Fig. 5 eine runde Vorrichtung aus Startzone, Zone und Zielzone;
- 15 Fig. 6 eine sternförmige Vorrichtung aus Startzone und Analysefeld;
- Fig. 7 eine sternförmige Vorrichtung aus Startzone, Zone und Zielzone;
- Fig. 8 eine sechseckige Vorrichtung aus Startzone und Analysefeld;
- 20 Fig. 9 eine sechseckige Vorrichtung aus Startzone, Zone und Zielzone.

Einführend sei festgehalten, daß in den unterschiedlich beschriebenen Ausführungsformen gleiche Teile mit gleichen Bezugszeichen bzw. gleichen Bauteilbezeichnungen versehen werden, wobei die in der gesamten Beschreibung enthaltenen Offenbarungen sinngemäß auf gleiche Teile mit gleichen Bezugszeichen bzw. gleichen Bauteilbezeichnungen übertragen werden können. Auch sind die in der Beschreibung gewählten Lageangaben, wie z.B. oben, unten, seitlich usw. auf die unmittelbar beschriebene sowie dargestellte Figur bezogen und sind bei einer Lageänderung sinngemäß auf die neue Lage zu übertragen. Weiters können auch Einzelmerkmale oder Merkmalskombinationen aus den gezeigten und beschriebenen unterschiedlichen Ausführungsbeispielen für sich eigenständige, erfinderische oder erfindungsgemäße Lösungen darstellen.

25

30

Die Fig. 1 zeigt eine Seitenansicht einer Vorrichtung 1 auf einem Trägermaterial 2, wobei das zumindest eine kapillarfähige Material 3 mittels einer Verbindungsschicht 4, wie z. B. einem

35

Doppelklebefilm, mit dem Trägermaterial 2 verbunden ist. Ein Aufbringen des kapillarfähigen Materials auf ein einseitig klebendes Trägermaterial (laminieren) ist auch möglich. Auf der Vorrichtung 1 sind eine Startzone 5 und eine weitere Zone 6, die aus zumindest einem kapillarfähigen Material 3 gebildet ist, angeordnet.

5

Die Fig. 2 zeigt eine weitere Ausführungsform der Vorrichtung 1, wobei bereits an dieser Stelle bemerkt sei, daß die Erfindung nicht auf die speziell dargestellten Ausführungsvarianten derselben eingeschränkt ist, sondern vielmehr auch diverse Kombinationen der einzelnen Ausführungsvarianten untereinander möglich sind und diese Variationsmöglichkeit aufgrund der Lehre zum technischen Handeln durch gegenständliche Erfindung im Können des auf dem

10 diesen technischen Gebiet tätigen Fachmannes liegt. Es sind also auch sämtliche denkbaren Ausführungsvarianten, die durch Kombinationen einzelner Details der dargestellten und beschriebenen Ausführungsvariante möglich sind, vom Schutzzumfang mitumfaßt.

15

Die Fig. 2 zeigt eine Seitenansicht einer Vorrichtung 1 auf einem Trägermaterial 2, wobei das Trägermaterial 2 über eine Verbindungsschicht 4 mit zumindest einem kapillarfähigen Material 3 verbunden ist. Auf dem kapillarfähigen Material 3 sind eine Startzone 5, eine Zone 6 und eine Zielzone 7 angeordnet. Die Zone 6 besteht aus mehreren Feldern, wie z.B. einem Konjugatfeld 8 mit spezifischen Bindungspartnern, an welche zumindest eine Substanz konjugiert ist, zumindest einem Lauffeld 9, einem Analyse- 10 und/oder Kontrollfeld 11 und einem Farbstofffeld 12.

20

Die Fig. 3 zeigt eine viereckige Vorrichtung 1, wobei in der Zone 6 mehrere Analysefelder 10 angeordnet sind. Auf jedem dieser Analysefelder 10 kann ein unterschiedlicher Analyt 13 gebunden sein und die Vorrichtung 1 somit für den Nachweis mehrerer verschiedener Analyten 13 verwendet werden. In einer alternativen nicht dargestellten Ausführungsvariante kann die Startzone 5 auch zentral an der Vorrichtung 1 angeordnet sein, wobei sich die Analysefelder 10 auf allen Seiten der Startzone 5 befinden können. Es können auch mehrere Zielzonen 7 an der Vorrichtung 1 angeordnet sein.

25

Die Fig. 4 zeigt eine runde Ausführungsform der Vorrichtung 1 wie sie in Fig. 1 beschrieben ist. Angrenzend an die Startzone 5 befindet sich eine weitere Zone 6, in welcher der Nachweis des zumindest einen Analyten 13 stattfindet.

30

Die Fig. 5 zeigt eine runde Ausführungsform der Vorrichtung 1, wobei sich angrenzend an die

35

Startzone 5 ein Konjugatfeld 8, ein Farbstofffeld 12, mehrere Lauffelder 9, zumindest ein Analysefeld 10 und/oder ein Kontrollfeld 11 und eine Zielzone 7 befinden.

Die Fig. 6 und 7 zeigen sternförmige Ausführungen der Vorrichtung 1, wobei in Fig. 6 die Vorrichtung 1 nur von einer Startzone 5 und einer angrenzenden Zone 6 gebildet wird und in Fig. 7 eine Startzone 5, eine Zielzone 7 und eine Zone 6 bestehend aus einem Konjugatfeld 8, einem Farbstofffeld 12, mehreren Lauffeldern 9, zumindest einem Analysefeld 10 und/oder einem Kontrollfeld 11 dargestellt sind. Die verschiedenen Zonen 6 sind kreisförmig auf der Vorrichtung 1 angeordnet.

Die Fig. 8 und 9 zeigen oktagonale Ausführungsformen der Vorrichtung 1, wobei in Fig. 8 die Vorrichtung 1 nur von einer Startzone 5 und einer angrenzenden Zone 6 gebildet wird und in Fig. 9 eine Startzone 5, eine Zielzone 7 und eine Zone 6 bestehend aus einem Konjugatfeld 8, einem Farbstofffeld 12, mehreren Lauffeldern 9, zumindest einem Analysefeld 10 und/oder einem Kontrollfeld 11 dargestellt sind.

Die verschiedenen Zonen 6 bzw. Felder können in unterschiedlichen Formen, wie z.B. linear, kreisförmig, dreieckig, viereckig, hexagonal, pentagonal, heptagonal, oktagon, trapezoid, rhomboid, etc., auf der Vorrichtung 1 angeordnet sein.

Das kapillarfähige Material, welches einen Filter darstellt, besteht aus Zellulose und/oder deren Derivaten, aus organischen Polymeren und ihren Derivaten, insbesondere aus Materialien, die wenig Proteine an ihrer Oberfläche adsorbieren, wie z.B. Glasfaser, Keramik, Polytetrafluorethylen (PTFE), Nylon, Polyvinylidenfluorid (PVDF), Materialien auf Silizium-Basis, Materialien biologischen Ursprungs, Acetate oder aus Gemischen oder Modifikationen dieser Materialien. Die Filter sind mit einer Porengröße, ausgewählt aus einem Bereich mit einer oberen Grenze von 50 μm , vorzugsweise 40 μm , insbesondere 35 μm und einer unteren Grenze von 0,20 μm , vorzugsweise 5 μm und insbesondere 10 μm . Besonders vorteilhaft haben sich auch Filter mit einer Porengröße ausgewählt aus einem Bereich mit einer oberen Grenze von 30 μm , vorzugsweise 25 μm , insbesondere 20 μm und einer unteren Grenze von 12 μm , vorzugsweise 15 μm , insbesondere 17 μm . Es können auch Vorfilter mit einer undefinierten Porengröße verwendet werden. Insbesondere im Bereich der Startzone 5 und im Bereich der Lauffelder 9 bzw. im Bereich der Zielzone 7 kann das kapillarfähige Material von einem Filter mit beliebig definierter Porengröße ausgebildet sein.

Das kapillarfähige Material 3 der Vorrichtung 1 weist eine Dicke, ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,05 mm, vorzugsweise 0,08 mm, insbesondere 0,15 mm und einer oberen Grenze von 2 mm, vorzugsweise 1,5 mm, insbesondere 1 mm, auf. Besonders hat sich eine Dicke, ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 mm, vorzugsweise 0,15 mm, insbesondere 0,2 mm und einer oberen Grenze von 0,9 mm, vorzugsweise 0,8 mm, insbesondere 0,5 mm, erwiesen. Die Dicke des kapillarfähigen Materials 3 kann in den unterschiedlichen Zonen 6 bzw. den verschiedenen Feldern variieren; d. h. daß die Vorrichtung 1 keine einheitliche Dicke über ihre gesamte Ausdehnung aufweisen muß.

Die verschiedenen Zonen 6 der Vorrichtung 1 können aus dem selben kapillarfähigen Material 3 oder aus unterschiedlichen kapillarfähigen Materialien 3 bestehen. Wie in Fig. 2 gezeigt wird, kann die Vorrichtung 1 in der Start- und Zielzone 7 aus einem anderen Material als in der Zone 6 bestehend aus Feldern ausgebildet sein. Auch die Dicke und die Porengröße des kapillarfähigen Materials 3 kann in den verschiedenen Zonen 6 unterschiedlich sein.

Zur Absättigung der freien unspezifischen Bindungsstellen wird das kapillarfähige Material mit Lösungen beinhalten Proteine wie BSA, Milchpulver, Casein, Gelatine, fettfreies Milchpulver, Kälberserum, etc. und/oder mit kommerziellen Blockungsreagenzien, wie z.B. Blotto oder Superblock (Fa. Pierce) in einer Konzentration von 0,1 - 10 mg/ml und/oder Detergenzien, wie z.B. Tween, Triton, Nonidet P-40, Chaps, etc. in einer Konzentration von 0,005 bis 5 Gew.-% blockiert.

Im Analysefeld 10 ist eine vorbestimmbare Menge des zumindest einen Analyten 13 in einer Konzentration ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,5 ng/ml, insbesondere 1 ng/ml, vorzugsweise 2 ng/ml, und einer oberen Grenze von 5 mg/ml, insbesondere 3 mg/ml, vorzugsweise 1 mg/ml, immobilisiert. Der zumindest eine Analyt 13 kann sowohl direkt als auch indirekt nachgewiesen werden, wie z.B. durch den Analyt 13 selbst, einen spezifischen Analytbindungspartner oder einen markierten Bindungspartner. Der indirekte Nachweis erfolgt durch die Bindung des Analyten 13 an einen ersten spezifischen Bindungspartner, z.B. primärer Antikörper. Im Analysefeld wird dann entweder dieser oder der Analyt (an einer anderen Stelle) durch einen zweiten spezifischen Bindungspartner, z.B. sekundärer Antikörper, welcher im Analysefeld 10 immobilisiert ist, erkannt und gebunden. Das Vorhandensein des Analyten im Analysefeld 10 wird schließlich mit einem weiteren spezifischen Bindungspartner, welcher mit einer Substanz konjugiert ist, der entweder den Analyten selbst (an einer anderen Stelle) bzw. den Analyten gebunden an den ersten spezifischen Bindungspartner oder

den zweiten spezifischen Bindungspartner erkennt, nachgewiesen.

Im Analysefeld 10 ist zumindest ein Analyt 13 immobilisiert. Alternativ zum Analyten 13 kann auch ein analytspezifischer Bindungspartner im Analysefeld 10 immobilisiert sein. In diesem Fall muß für die Detektion des Analyten 13 der spezifische Bindungspartner, welcher mit einer Substanz konjugiert ist, spezifisch für den Analyten sein und diesen an einer anderen Stelle binden. Es kann eine Vielzahl von verschiedenen Analyten 13 nachgewiesen werden. Der zumindest eine Analyt 13 kann aus einer Gruppe umfassend Drogen bzw. Drogenersatzstoffe umfassend Cannabisprodukte, wie z.B. Marihuana, Haschisch und/oder Cannabinol, Kokain, wie z.B. Benzoyllecgonine, Crack und/oder Crystal, Opiate, wie z.B. Morphin, Acetylmorphin, Heroin, Codein, Propoxyphene und/oder Fentanyl, Nikotin, Kotinin, d-Lysergsäurediethylamid (LSD), Psilocybin und Psilocin, Mescaline und Peyote, Methadon oder Methadonmetabolite, oder eine Designerdroge, wie z.B. Amphetamine (MDA, Dimethoxybromamphetamin, etc.), Methamphetamine (wie z.B. Ecstasy, MDMA), Phencyclidin (Engelsstaub), γ -Hydroxybuttersäure (Liquid Ecstasy), Antiepileptika, wie z.B. Phenytoin, Dopingmittel aus einer Gruppe umfassend Anabolika, wie z.B. Testosteron und seine Derivate, Somatotropin, Ephedrin-Derivate, Analeptika, wie z.B. Strychnin, Amphetamin-Derivate, Analgetika, Antitussiva, Mittel zur Steigerung der Sauerstofftransportkapazität und der Sauerstoffverfügbarkeit für die Skelettmuskulatur, wie z.B. Erythropoietin und/oder Diuretika, Arzneimittel, Analgetika oder Psychopharmaka aus einer Gruppe umfassend, Neuroleptika, wie z.B. Phenothiazin, Butyrophenone und/oder Thioxanthene, Antidepressiva, wie z.B. MAO (Monoaminoxidase)-Hemmer, Imipramin, Desipramin, Amitriptylin, etc., Tranquilizer, wie z. B. Benzodiazepine (Diazepam), Barbiturate und/oder Psychoanaleptika, Stimulantien, wie z.B. Phenylethylamin, Antiepileptika und/oder Hypnotika, Antikörper, gebildet als Reaktion auf virale, viroide, bakterielle, mykotische, parasitäre bzw. auf Prionen basierende Infektionen und/oder gebildet infolge von Immunisierungen (Impfung beim Menschen oder Tier bzw. polyklonale Antikörperherstellung bei Tieren) und/oder gebildet infolge von Autoimmunkrankheiten oder allergischen Reaktionen, Hormone, wie z.B. HCG (human chorion Gonadotropin), Proteine als Tumormarker aus einer Gruppe umfassend squamous cell carcinoma antigen (SCC), Thyreoglobulin (Tg), Steroidhormonrezeptoren, Prostata-spezifisches Antigen (PSA), Neuronen-spezifische Enolase (NSE), Carcinoembryonales Antigen (CEA), Alpha-Fetoprotein (AFP), CYFRA 21-1, CA 125, 19-9, 72-4, 15-3 und/oder humanes Calcitonin (hCT), MCA (Mucine-like cancer associated antigen), Toxine aus einer Gruppe umfassend Botulinumtoxin, Toxine aus Tieren, Pflanzen, wie: Pilzen, Bakterien, Algen, Pflanzen und ihren Bestandteilen, Lebensmitteln und/oder Toxine künstlichen Ursprungs, z.B. Kampfgifte,

und/oder Schwermetalle, Herbizide, Fungizide, Pestizide, Bakterizide, Antibiotika, Konservierungsmittel, etc., ausgewählt sein. Des weiteren können auch Allergene wie. z.B. Pollen, Hausstaubmilbenkot, Histamin, etc. nachgewiesen werden. Von immer größer werdender Bedeutung ist auch der Nachweis von Prionen aus dem Nervensystem verschiedener Säugetiere als auch aus Futtermitteln oder Nahrungsmitteln um eine Ausbreitung der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit zu verhindern. Als Analyt 13 können auch Marker oder speziesspezifische Proteine, welche in der Gentechnologie verwendet werden um gentechnologisch veränderte Lebensmittel, Saatgut, etc. zu identifizieren, nachgewiesen werden. Es können des weiteren auch verschiedene Antikörper(sub)typen nachgewiesen werden.

10

Durch die Immobilisierung des zumindest einen Analyten 13 in unterschiedlichen Konzentrationen in den Analysefeldern 10 kann eine semiquantitative Bestimmung des Analyten 13 durchgeführt werden. Die Konzentration des zumindest einen Analyten 13 in der Verdünnungsreihe nimmt mit einem Faktor, ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 1, insbesondere 2, vorzugsweise 3 und einer oberen Grenze von 100, insbesondere 10, vorzugsweise mit einem Faktor 5 ab.

15

Der Analyt 13 kann aus einer Probe biologischen Ursprungs, wie Körperflüssigkeiten aus Mensch und Tier, wie z.B. Blut, Plasma, Serum, Urin, Speichel, Schweiß, Sperma, etc. und/oder pflanzlichen Ursprungs, wie z.B. Blatt, Frucht, Samen, etc. und/oder mikrobiologischen Ursprungs stammen. Der Analyt 13 kann auch aus dem Boden bzw. aus Wasser nachgewiesen werden. Um eine Analyse von Stoffen aus der Luft durchzuführen bedarf es einer Ankonzentrierung des Analyten 13, z.B. durch Ansaugen größerer Luftvolumina mittels einer Pumpe, wobei die Anreicherung des Analyten 13 direkt auf dem Material der Startzone 5 erfolgen kann.

20

25

Im Farbstofffeld 12 sind eine oder mehrere Farbstoffkomponenten oder deren Vorstufen temporär immobilisiert. Die Farbstoffkomponenten müssen sich allerdings nicht notwendigerweise in einer Zone 6 befinden, sondern können auch auf mehrere Zonen 6 aufgeteilt sein, wie z.B. auf die Startzone 5, auf das Farbstofffeld 12, auf das Konjugatfeld 8 und das Lauffeld 9. Die Farbstoffkomponenten liegen in ungelöster Form vor. Die verwendeten Farbstoffkomponenten bzw. deren Vorstufen sind: Tyramin und dessen Derivate, X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid), S-Gal (3,4 Cyclohexenoesculetin- β -D-Galactopyranosid), ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid), CPRG (Chlorophenol red- β -D-Galactopyranosid), Bluogal (5-Brom-3-Indolyl- β -D-Galactosid), MUGal (4-Methylumbelliferyl- β -D-Galacto-

30

35

pyranosid), NBT (Nitroblue Tetrazolium Chlorid), BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat), PNPP (p-Nitrophenyl Phosphat), OPD (o-Phenylenediamine), ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenz-thiazoline Sulfonic Acid), DAB (3,3-Diaminobenzidine), TMB (3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine), Phenazinmethosulfat, Kaliumferrocyanid, Kaliumferricyanid, Ferric Ammoniumcitrat, VectorBlack™, Chemilumineszenzfarbstoffe, wie z.B. Galacton-Star Substrat, Lumi-Phos™ plus, LuciGLO™, DuoLuX™, Lumigen PS-3, Chemiluminescent HRP (horseradishperoxidase) Substrat, 2 Component System from BioFX™, und/oder Lumi-Gal 530 und/oder Fluoureszenzfarbstoffe, z.B. 3-Carboxyumbelliferyl-β-D-Galactopyranosid (CUG) und/oder MUP (4-Methylumbelliferyl-Phosphat). Die Konzentration der Farbstoffkomponenten und deren Vorstufen ist, jeweils in Gew-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,01 %, insbesondere 0,1 %, vorzugsweise 1 %, und einer oberen Grenze von 20 %, insbesondere 10 %, vorzugsweise 4 %, ausgewählt.

Im Feld mit den Farbstoffkomponenten können auch andere Substanzen, wie z.B. BSA, Maltrin, Milchpulver, Casein, Gelatine, in den Konzentrationen ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 %, insbesondere 1 %, vorzugsweise 5 %, und einer oberen Grenze von 50 %, insbesondere 30 %, vorzugsweise 10 %, zugefügt werden, um die Adsorption der Farbstoffkomponenten an die Vorrichtung 1 zu vermindern, bzw. die Löslichkeit der Farbstoffe zu erhöhen.

Im Konjugatfeld 8 kommen insbesondere spezifische Bindungspartner wie z.B. Antikörper gegen Analyten 13, die mit einem Katalysator, wie z.B. einem organischen oder anorganischen Katalysator oder Enzymen oder Proteinen, wie z.B. β-Galactosidase, Peroxidase, alkalische Phosphatase, Streptavidin/Avidin, Protein A oder ähnliche zu hochaffinen spezifischen Bindungen befähigte Moleküle etc., konjugiert sind, vor. Alternativ können auch mehrere unterschiedliche Substanzen gleichzeitig oder in einer vordefinierten Reihenfolge an einen spezifischen Bindungspartner konjugiert sein. Die Konzentration der spezifischen Bindungspartner, an welche die Substanz konjugiert ist, beträgt, ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,5 ng/ml, insbesondere 1 ng/ml, vorzugsweise 2 ng/ml, und einer oberen Grenze von 5 mg/ml, insbesondere 2 mg/ml, vorzugsweise 1 mg/ml. Besonders vorteilhaft haben sich auch Konzentrationen ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 mg/ml, vorzugsweise 0,2 mg/ml, insbesondere 0,3 mg/ml, und einer oberen Grenze von 2 mg/ml, vorzugsweise 1 mg/ml, insbesondere 0,5 mg/ml, erwiesen.

Im Kontrollfeld 11 befindet sich ein immobilisierter spezifischer Bindungspartner, z.B. ein

Antikörper für zumindest eine Substanz, wie z.B. β -Galactosidase, alkalische Phosphatase, Peroxidase, Streptavidin/Avidin, Protein A oder ähnliche zu hochaffinen spezifischen Bindungen befähigte Moleküle etc., in einer Konzentration ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,5 ng/ml, insbesondere 1 ng/ml, vorzugsweise 2 ng/ml, und einer
5 oberen Grenze von 5 mg/ml, insbesondere 3 mg/ml, vorzugsweise 1 mg/ml.

In der Zielzone 7 und den Lauffeldern 9 ist es nicht notwendig eine Substanz oder einen Analyten 13 zu immobilisieren.

10 Es können in einem Feld auch mehrere Analyten oder Kombinationen aus z. B. spezifischen Bindungspartnern, Substanzen und/oder Farbstoffkomponenten oder deren Vorstufen vorliegen.

Zur Durchführung des Verfahrens wird eine kleine Menge einer Probe mit einem saugfähigen
15 Material, wie z.B. einem Wattestäbchen gesammelt. Der an dem saugfähigen Material haftende Analyt 13 wird in einem Reagens, insbesondere organischen Reagens, aufgenommen. Drei bis sieben Tropfen dieses mit Analyten 13 versehenen Reagens werden auf die Vorrichtung 1 aufgebracht. Das Reagens mit dem Analyten 13 wandert in dem kapillarfähigen Material 3 der Vorrichtung 1 mit einer Geschwindigkeit von 1 bis 12 cm/Minute von der Startzone 5 beispielsweise durch die Zone 6 bestehend aus zumindest einem Konjugatfeld 8, Farbstofffeld 12,
20 Lauffeld 9, Analyse- 10 und Kontrollfeld 11 und zuletzt in die Zielzone 7. Falls im Reagens mit der Probe eine ausreichende Menge des Analyten 13 vorhanden ist und alle Bindungsstellen der spezifischen Bindungspartner abgesättigt sind, können diese somit nicht mehr an die immobilisierten Analyten 13 im Analysefeldes 10 binden. Eine detektierbare Menge des Analyten 13 ergibt auf der Vorrichtung 1 nur eine Markierung im Kontrollfeld 11, weil die Bindungspartner bereits abgesättigt sind und nicht mit den immobilisierten Analyten 13 an der
25 Vorrichtung 1 reagieren. Im Falle, daß in der Probe kein Analyt 13 bzw. eine unzureichende Menge zur Detektion des Analyten 13 vorhanden ist, ergeben sich auf der Vorrichtung 1 zwei Markierungen, wobei sich die erste Markierung aus der Bindung des analytspezifischen und/
30 oder substanzkonjugierten analytspezifischen Bindungspartner im Analysefeld 10 ergibt und die zweite Markierung resultiert aus der Bindung der immobilisierten Bindungspartner spezifisch für die Substanz, wie z.B. β -Galactosidase in Reaktion mit einer Farbstoffkomponente oder deren Vorstufe.

35 Im Falle des Fehlens des zu bestimmenden Analyten 13 in der Probe bindet der analytspezifische

sche Bindungspartner im Analysefeld 10 und der analytspezifische Bindungspartner, an welchen zumindest eine Substanz konjugiert ist, wie z.B. β -Galactosidase, reagiert mit der vorbeilaufenden Farbstoffkomponente bzw. deren Vorstufen in der Weise, daß der gebildete Farbstoff bzw. Farbstoffkomplex entweder unlöslich oder schwer löslich am Analysefeld 10 verbleibt und/oder durch Antikörper gegen den gebildeten Farbstoffkomplex, detektiert werden kann. Der spezifische Bindungspartner, an welchen zumindest eine Substanz konjugiert ist, kann mehrere Bindungsstellen für Farbstoffe bzw. Farbstoffkomplexmoleküle, die eine gut sichtbare Markierung erzeugen, tragen.

10 Ist eine ausreichende Menge des Analyten 13 vorhanden, bindet diese an die analytspezifischen Bindungspartner, welche mit einer Substanz konjugiert sind, und diese Bindungspartner können daher nicht mehr an den immobilisierten Analyten 13 im Analysefeld 10 binden und laufen ohne Ausbildung einer sichtbaren Markierung in die Zielzone 7 der Vorrichtung 1. Unabhängig vom Vorhandensein des nachzuweisenden Analyten 13 in der Probe, binden entweder die analytspezifischen Bindungspartner, welche mit einer Substanz konjugiert sind, oder die Substanz selbst, an das Kontrollfeld 11 an entsprechend substanzspezifische Bindungspartner, wobei die somit gebundene Substanz mit dem vorbeilaufenden Farbstoffkomponenten bzw. deren Vorstufen in der Weise reagieren, daß der gebildete Farbstoffkomplex unlöslich oder schwer löslich am Ort verbleibt und/oder durch einen Antikörper gegen den gebildeten Farbstoffkomplex, welche immobilisiert im Kontrollfeld 11 angebracht ist, mit der Fortdauer des Tests in großer Anzahl gebunden werden und dort eine gut sichtbare Markierung ausbilden, nachgewiesen werden können.

Im Kontrollfeld 11 befindet sich ein immobilisierter Antikörper gegen die Substanz, wie z.B. β -Galactosidase. Wie bereits erwähnt findet die Reaktion im Kontrollfeld 11 in jedem Fall statt, unabhängig davon, ob im Laufmittel eine ausreichende Menge des Analyten 13 vorhanden war.

Der Nachweis eines Analyten 13 mit dem Enzym β -Galactosidase als Verstärkersystem erfolgt durch die Spaltung von natürlichen oder künstlichen β -D-Galactosiden in Galactose und die entsprechenden Rest-Verbindungen. Unphysiologische Substrate für das Enzym, wie ONPG oder X-gal ergeben nach der Hydrolyse und Oxidation farbige Reaktionsprodukte und erlauben eine visuelle und auch spektrophotometrische Detektion.

35 Als alternatives Verstärkungssystem können Streptavidin und Avidin, Proteine mit multiplen

Bindungsstellen für Biotin eingesetzt werden. Beispielsweise kann ein spezifischer Bindungs-
partner mit Biotin markiert werden. Proteine wie Streptavidin und Avidin binden mit einer
ihrer vier Bindungsstellen hochspezifisch an Biotin. Freie Biotin-Bindungsstellen werden
dann mit biotinmarkiertem Enzym, z.B. alkalische Phosphatase, abgesättigt. Durch die Zu-
5 gabe von chromogenen Substraten fällt ein Farbgemisch aus, wodurch die Bindung nachge-
wiesen werden kann. Da die biotinbindenden Proteine vier Biotin-Bindestellen enthalten und
die verwendeten Enzyme ebenfalls mehrere Biotin-Gruppen tragen können, können sich
Komplexe mit vielen Protein-Enzym-Biotin-Molekülen ausbilden, wodurch die Nachweis-
empfindlichkeit wesentlich erhöht wird. Alkalische Phosphatase wird als Markerenzym ein-
10 gesetzt, da sich in Verbindung mit geeigneten Substraten ein empfindliches, histochemisches
Farbreagens und Signalverstärkersystem entwickeln läßt. Substrate wie z.B. p-Nitrophenyl-
phosphat ergeben nach der hydrolytischen Spaltung durch das Enzym farbige, photometrisch
leicht meßbare Reaktionsprodukte, oder, wie im Falle des 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
(BCIP=X-Phosphat), einen tiefblau gefärbten unlöslichen, leicht erkennbaren Niederschlag
15 von Indigo. BCIP wird in der Regel zusammen mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT) als Farbver-
stärker verwendet.

Als weiteres alternatives Verstärkungssystem kann das Enzym Peroxidase (HRP) mit deriva-
tisiertem Tyramin verwendet werden (Super-CARD, Catalytic deposition of derivatized tyra-
mine, Bhattacharya, R., Bhattacharya, D., and Dhar, T. K. (1999) Journal of Immunological
20 Methods 227, 31-39). Dabei ist z.B. der spezifische Bindungspartner mit dem Enzym Peroxi-
dase (HRP) gekoppelt und katalysiert mit Hilfe von H₂O₂ (welches im Reagens vorhanden
oder durch eine chemische Reaktion direkt gebildet wird) die kovalente Bindung des derivati-
sierten Tyramin an das Analysefeld (konkret an dafür spezielle modifizierte Proteine (p-OH-
25 PPA-Casein, p-OH-PPA-Gelatin oder p-OH-PPA-BSA; p-OH-PPA=3-(p-Hydroxyphenyl)-
propionsäure) die auf dem Analysefeld immobilisiert sind). Als Molekül welches an Tyramin
gekoppelt ist, wird entweder direkt ein Farbstoff, Goldpartikel (NanoGold) oder ein Kataly-
sator in Frage. In letzterem Fall z.B. Peroxidase (HRP), ergibt sich somit mittels eines histo-
chemischen Farbreagens ein vielfach verstärktes Signal.

30 Das Reagens, das zur Aufnahme der Probe dient, besteht aus einwertigem Alkohol mit 1 bis
5 Kohlenstoffatomen, Ketonen mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen, mehrwertigen Alkoholen, ins-
besondere Ethylenglycol und Polyethylenglycol. Die Konzentrationen dieser chemischen
Verbindungen sind aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 %, insbesondere 5 %,
35 vorzugsweise 10 %, und einer oberen Grenze von 40 %, insbesondere 30 %, vorzugsweise

20 %, ausgewählt.

Dem Reagens kann zusätzlich noch ein Detergens, insbesondere (Octylphenoxy)-polyethoxyethanol, Alkylphenolpolyglycolether, Tween 20, Natriumdeoxycholat, Nonidet P-40 (Igepal
5 CA-630), Triton X-100, Cholic acid, Deoxycholic acid und/oder Zwittergent® in einer Konzentration ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,001 %, insbesondere 0,005 %, vorzugsweise 0,01 %, und einer oberen Grenze von 1 %, insbesondere 0,5 %, vorzugsweise 0,2 % als Lösungsvermittler zugesetzt werden.

10 Dem Reagens kann zusätzlich ein Puffer zugesetzt werden, welcher das Reagens in einem pH-Wertbereich konstant hält. Bevorzugt werden hierbei dem Reagens Pufferlösungen, wie z.B. Citratpuffer, Acetatpuffer, Maleatpuffer, Phosphatpuffer, Collidinpuffer, Triethanolamin-HCl-EDTA-Puffer, Trispuffer, Ammediolpuffer, Glycinpuffer, Diethanolaminpuffer oder
15 Tris-Borsäure-EDTA-Puffer, oder Puffer nach Good, N. E. et al. (1966) Biochemistry 5, 467, zugesetzt. Die Konzentration der Pufferlösungen ist jeweils in Gewichtsprozent aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 %, vorzugsweise 1 % und insbesondere 2 % hat und mit einer oberen Grenze von 20 %, vorzugsweise 15 %, insbesondere 10 %, ausgewählt. Die Pufferlösung hat einen pH-Wert ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 5,5, insbesondere 6,0, vorzugsweise 6,5, und einer oberen Grenze von 9,5, insbesondere
20 9,0, vorzugsweise 8,5. Als besonders vorteilhaft haben sich Pufferlösungen mit einem pH-Wert mit einer unteren Grenze von 6,8, vorzugsweise 7,0, insbesondere 7,2 und einer oberen Grenze von 8,0, vorzugsweise 7,8, insbesondere 7,6 erwiesen.

Durch den Zusatz einer Mischung der genannten Puffer gelingt es, das Reagens über einen
25 größeren pH-Wertbereich abzupuffern und somit auch bei Untersuchungen von verunreinigten Proben ein korrektes Analyseergebnis sicherzustellen. Auch Verunreinigungen durch das vorhandene Puffersystem werden mit Sicherheit soweit abgepuffert, daß sie die Analysereaktion des zumindest einen Analyten 13 nicht stören.

30 Dem Reagens kann des weiteren zumindest eine Farbstoffkomponente bzw. deren Vorstufe zugesetzt werden, wobei die Farbstoffkomponenten aus einer Gruppe ausgewählt sind, umfassend Tyramin und dessen Derivate, X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid), S-Gal (3,4 Cyclohexenoesculetin- β -D-Galactopyranosid), ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid), CPRG (Chlorophenol red- β -D-Galactopyranosid), Bluogal (5-Brom-3-Indolyl- β -
35 D-Galactosid), MUGal (4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactopyranosid), NBT (Nitroblue

Tetrazolium Chlorid), BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat), PNPP (p-Nitrophenyl Phosphat), OPD (o-Phenylenediamine), ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenz-thiazoline Sulfonic Acid), DAB (3,3-Diaminobenzidine), TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine), Phenazinmethosulfat, Kaliumferrocyanid, Kaliumferricyanid, Ferric Ammoniumcitrat, Vector-
5 Black™, Chemilumineszenzfarbstoffe, wie z.B. Galacton-Star Substrat, Lumi-Phos™ plus, LuciGLOT™, DuoLuXT™, Lumigen PS-3, chemiluminescent HRP (horseradishperoxidase) Substrat, 2 Component System from BioFX™, und/oder Lumi-Gal 530 und/oder Fluoreszenzfarbstoffe, z.B. 3-Carboxyumbelliferyl-β-D-Galactopyranosid (CUG) und/oder MUP (4-Methylumbelliferyl-Phosphat). Die Konzentration der Farbstoffkomponenten ist aus einem
10 Bereich mit einer unteren Grenze von 1 μM, insbesondere 10 μM, vorzugsweise 50 μM, und einer oberen Grenze von 300 mM, insbesondere 150 mM, vorzugsweise 100 mM, ausgewählt.

Die Farbstoffkomponenten und/oder deren Vorstufen werden im Reagens gelöst und werden dort durch die Zugabe der Komponenten des Reagens, BSA, Maltodextrin, Milchpulver, Kälberserum, Casein und/oder Gelatine zeitlich verzögert gelöst bzw. über die Vorrichtung 1
15 durch die Kapillarwirkung transportiert.

Um die Osmolarität des Reagens zu erhöhen, können Natriumsalze, Kaliumsalze, Phosphatsalze, Magnesium- und/oder Mangansalze, BSA, Maltodextrin (Maltrin) oder Milchpulver in
20 einer Konzentration aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,001 %, insbesondere 0,1 %, vorzugsweise 1 %, und einer oberen Grenze von 30 %, insbesondere 20 %, vorzugsweise 10 %, zugesetzt werden.

Weiters kann dem Reagens ein Konservierungsmittel, insbesondere Natriumazid, Natriumbenzoat, Sorbinsäure, Pentachlorophenol, Sorbat und/oder Konservierungsmittel auf Quecksilber-Basis, in einer Konzentration aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,01 %, insbesondere 0,05 %, vorzugsweise 0,1 %, und einer oberen Grenze von 5 %, insbesondere 3 %, vorzugsweise 1 %, zugesetzt werden, um die Haltbarkeit des Reagens zu verlängern. Die Farbstoffkomponenten und/oder deren Vorstoffen befinden sich im Reagens oder teilweise im
30 Reagens oder befinden sich komplett oder teilweise im Farbstofffeld 12 oder komplett oder teilweise in Startzone 5 der Vorrichtung 1 in ungelöster Form.

Der erfindungsgemäße Analysekit umfaßt eine Vorrichtung 1 zum Nachweis zumindest eines Analyten 13, das Reagens einen saugfähigen Stoff, wie z.B. ein Wattestäbchen oder ähnliches. Um die Durchführung des Analyseverfahrens weiter zu vereinfachen, kann der Analyse-
35

kit auch weitere Hilfsmittel, wie z.B. Handschuhe, Stoppuhr, Pipetten, etc., enthalten.

Die zwei folgenden Ausführungsbeispiele zeigen mögliche Durchführungsmöglichkeiten des Verfahrens, wobei an dieser Stelle bemerkt sei, daß die Erfindung nicht auf die speziell angeführten Ausführungsbeispiele beschränkt ist, sondern vielmehr sämtliche denkbare Ausführungsbeispiele die durch Kombinationen einzelner Details der beschriebenen Möglichkeiten vom Schutzzumfang mitumfaßt sind

Ausführungsbeispiel 1:

10

Vorrichtung 1 zur Bestimmung von Benzodiazepinen im Speichel

Die Start- 5 und Zielzone 7 ist aus aus Cellulose Absorbent Paper (Pall Corporation, Type 165 für die Startzone 5 (BSP165PK) und Typ 197 für die Zielzone 7 (BSP197PK)) hergestellt.

15

Das Format der Start- 5 und Zielzone 7 beträgt 25 x 80 mm. Das Filterpapier wird ohne weitere Imprägnierung zur Herstellung der Vorrichtung 1 verwendet.

20

Das Farbstofffeld 12 wird aus Glasfaser-Mikrofilter Sorte GF/D (Whatman) hergestellt. Das Format des Farbstofffeldes 12 beträgt 5 x 80 mm und wird mit 80 µl der Farbstofflösung gleichmäßig beschickt. Anschließend erfolgt eine Trocknung unter Lichtausschluß bei 20 °C. Die Farbstofflösung besteht aus: X-Gal (100 mM), NBT (50 mM), Phenazine Methosulfate (1 mM), BSA (4 %), Maltrin (1 %) in PBS (5 mM KH₂PO₄, 15 mM Na₂HPO₄, 120 mM NaCl, 2,3 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,05 % NaN₃, 5 % Ethanol, 0,1 % Triton X-100). Die Ausgangsreagenzien werden von der Fa. SIGMA-Aldrich hergestellt.

25

Das Konjugatfeld 8 besteht aus geblockter Accuwick® Membran (Fa. Pall, AW 14-20-10). Das Blocken der Membran erfolgt mit 1 % BSA in PBS Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur, anschließend Trocknung bei 20°C. Das Format beträgt wiederum 5 x 80 mm. Es werden 80 µl der Antikörperlösung gleichmäßig aufpipettiert und anschließend erfolgt die Trocknung bei 20 °C. Die Antikörperlösung besteht aus: primäre monoklonale Antikörper (Host Maus) gegen Benzodiazepine (25 nM), (Fitzgerald, Kat.Nr.: 10-B12) sekundäre, mit Beta-Galactosidase konjugierte Antikörper anti Maus (25nM) (Fa. Fisher Scientific) β-Galactosidase (25 nM), (Roche Applied Science), BSA (4 %), Maltrin (1 %) in PBS (5 mM KH₂PO₄, 15 mM Na₂HPO₄, 120 mM NaCl, 2,3 mM KCL, 2 mM MgCl₂, 0,05 % NaN₃, 0,1 % Triton X-100).

35

Für die Herstellung der Lauffelder 9 werden Streifen aus Zellulose-Acetatfilter (Fa. Osmonics Inc.) im Format 20 x 80 mm verwendet. Zur Blockierung von Bindungsstellen werden die Streifen in einer 1 % BSA-hältigen PBS-Lösung (5 mM KH_2PO_4 , 15 mM Na_2HPO_4 , 120 mM NaCl, 2,3 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0,05 % NaN_3 , 0,1 % Titron X-100) 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert.

5

Im Testfeld wird ein BSA-Benzodiazepinkonjugat (Fa. Fitzgerald) noch vor Blockung von Bindungsstellen immobilisiert. Dazu wird der Zellulose-Acetatfilter (AcetatePlus) in 100 mM Natriumperjodat (SIGMA-Aldrich) für 20 min inkubiert, anschließend mit H_2O gewaschen und mit einer 0,5 μM BSA-Benzodiazepin-Lösung in 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0) für 10 Minuten inkubiert. Anschließend werden 4 mg Natrium Cyanoborohydride (SIGMA-Aldrich) pro ml zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nichtgebundenes BSA-Benzodiazepin wird mittels H_2O gewaschen.

10

Im Kontrollfeld 11 wird ein spezifischer polyklonaler Antikörper gegen das Enzym β -Galactosidase (Fitzgerald, Host: Rabbit) noch vor Blockung der Bindungsstellen immobilisiert. Die Immobilisierung von 0,25 μM spezifischem polyklonalem Antikörper erfolgt nach der gleichen Methode wie im Testfeld.

15

Das verwendete Reagens, in welchem die Probe aufgenommen wird, besteht aus PBS (5 mM KH_2PO_4 , 15 mM Na_2HPO_4 , 120 mM NaCl, 2,3 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0,1 % BSA, 0,1 % Maltrin, 0,05 % NaN_3 , 5 % Ethanol, 0,05 % Triton X-100) mit einem pH-Wert von 7,1.

20

Die Startzone 5, die Felder der Zone 6 und die Zielzone 7 werden nach den beschriebenen Spezifikationen zugeschnitten und mittels doppelseitigen Klebefilms (Fa. Tesa AG) auf Trägerfolien Xeroperm (Rank Xerox Limited) befestigt. Davon werden mit einem Rollenschneidegerät Streifen von 4 mm geschnitten. Die Lagerung der Streifen erfolgt bei Raumtemperatur unter Ausschluß von Licht und Feuchtigkeit.

25

Ausführungsbeispiel 2

30

Vorrichtung 1 zur Bestimmung von Testosteron im Speichel

Die Start- 5 und Zielzone 7 werden aus Cellulose Absorbent Paper (Pall Corporation, Type 165 für das Auftragekissen (BSP165PK) und Typ 197 für das Aufnahmekissen (BSP197PK))

35

hergestellt. Es werden Streifen von 25 x 80 mm zugeschnitten, die ohne weitere Imprägnierung oder Vorbehandlung zur Herstellung der Vorrichtung 1 verwendet werden.

Das Farbstofffeld 12 wird aus ‚Glass Fiber Media‘ (Pall, A/D Glass) hergestellt. Es werden
5 Streifen im Format von 5 x 80 mm zugeschnitten und mit 80 µl der Farbstofflösung gleichmäßig beschickt. Anschließend erfolgt die Trocknung unter Lichtausschluß bei 20°C. Die Farbstofflösung besteht aus: X-Gal (100 mM), NBT (50 mM), Phenazine Methosulfate (1 mM), BSA (4%), Maltrin (1%) in PBS (5 mM KH₂PO₄, 15 mM Na₂HPO₄, 120 mM NaCl, 2,3 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,05% NaN₃, 5% Ethanol, 0,1% Triton X-100) (alle Lösungen stammen von der Fa. SIGMA-Aldrich).
10

Das Lauffeld 9, Analysefeld 10 und Kontrollfeld 11 bestehen aus einer 5 µm Immunodyne® ABC Membran im Format 20 x 80 mm (Fa. Pall, BC500H5R). Auf die Vorrichtung 1 wird an der Stelle des Analysefeldes 10 eine 0,5 µM Testosterone-3-CMO-BSA Lösung (Fa. Fitzgerald, 80-IT49) und an der Stelle des Kontrollfeldes 11 eine 0,25 µM Biotin-BSA Lösung (SIGMA-Aldrich) aufgetragen. Danach werden die restlichen Bindungsstellen auf der Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einer 1% BSA in PBS Lösung geblockt.
15

An die Stelle des Konjugatfeldes 8 auf der Vorrichtung 1 werden 10 nM des primären spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen Testosteron (Host: Maus, Fitzgerald:10-T07), 25 nM Biotinylated Anti-Mouse IgG Antikörper (Host: Pferd, Vector Laboratories:BA-2080) und 100 nM eines Avidin-Beta-Galactosidase Konjugates (SIGMA-Aldrich) direkt auf die geblockte Immunodyne® ABC Membran zwischen Startzone 5 und Analysefeld 10 aufgebracht.
20

Das verwendete Reagens, in welchem die Probe aufgenommen wird, besteht aus PBS (5 mM KH₂PO₄, 15 mM Na₂HPO₄, 120 mM NaCl, 2,3 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1% BSA, 0,1% Maltrin, 0,05% NaN₃, 5% Ethanol, 0,05% Triton X-100) mit einem pH-Wert von 7,1.
25

Die Kissen und die bestückte Immunodyne® ABC Membran werden nach den beschriebenen Spezifikationen zugeschnitten und mittels doppelseitigen Klebefilms (Fa. Tesa AG) auf dem Trägermaterial (Folie Xeroperm Typ 003R96094 der Fa. Rank Xerox Limited) befestigt. Davon werden mit einem Rollenschneidegerät Streifen von 4 mm geschnitten. Die Lagerung der Streifen erfolgt bei Raumtemperatur unter Ausschluß von Licht und Feuchtigkeit.
30

Abschließend sei auch noch erwähnt, daß insbesondere die Antikörper, welche in der Anti-
35

körperlösung vorliegen, jeweils auf den nachzuweisenden Analyten angepaßt sind.

Der Ordnung halber sei abschließend darauf hingewiesen, daß zum besseren Verständnis des Aufbaus der Fig. 1 bis 9 diese bzw. deren Bestandteile teilweise unmaßstäblich und/oder vergrößert und/oder verkleinert dargestellt wurden.

Die den eigenständigen erfinderischen Lösungen zugrundeliegende Aufgabe kann der Beschreibung entnommen werden.

Vor allem können die einzelnen in den Fig. 1 bis 9 gezeigten Ausführungen den Gegenstand von eigenständigen, erfindungsgemäßen Lösungen bilden. Die diesbezüglichen, erfindungsgemäßen Aufgaben und Lösungen sind den Detailbeschreibungen dieser Figuren zu entnehmen.

15

20

25

30

35

Bezugszeichenaufstellung

	1	Vorrichtung
5	2	Trägermaterial
	3	kapillarfähiges Material
	4	Verbindungsschicht
	5	Startzone
10	6	Zone
	7	Zielzone
	8	Konjugatfeld
	9	Lauffeld
	10	Analysefeld
15	11	Kontrollfeld
	12	Farbstofffeld
	13	Analyt
	14	Bindungspartner
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis zumindest eines Analyten aus einer Probe durch eine immunochemische Reaktion mit einer Vorrichtung bestehend aus mehreren Zonen, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt in einem Reagens, insbesondere einem organischen Reagens, auf eine Startzone aufgebracht wird und durch Kapillarkräfte in zumindest eine weitere Zone mit einem oder mehreren Feldern läuft, wobei in einem Feld zumindest ein spezifischer Bindungspartner, an welchen zumindest eine Substanz konjugiert ist, temporär immobilisiert ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt durch eine chemische oder physikalische Reaktion der zumindest einen Substanz oder durch eine chemische Reaktion katalysiert durch die Substanz, welche an den spezifischen Bindungspartner, wie z. B. einen Antikörper, konjugiert ist, nachweisbar wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die zumindest eine Substanz aus einer Gruppe umfassend alkalische Phosphatase, Peroxidase, z.B. vom Meerrettich, β -Galactosidase, Streptavidin/Avidin, Protein A oder zu hochaffinen spezifischen Bindungen befähigte Moleküle und/oder einem katalytisch wirkenden Stoff, ausgewählt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt durch eine Zone bestehend aus zumindest einem Feld ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Analysefelder, Kontrollfelder, Lauffelder, Farbstofffelder und/oder Konjugatfelder, läuft.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt aus einer Gruppe umfassend Wirkstoffe, Hormone, Proteine, Peptide, Allergene, Antigene, Antikörper, Neurotransmitter, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und/oder Lipide nachgewiesen wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Wirkstoffe aus einer Gruppe umfassend Drogen, Drogensatzstoffe, leistungssteigernde Substanzen wie Dopingmittel, Arzneimittel, Toxine oder deren Metaboliten, nachgewiesen werden.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Drogen bzw. Drogensatzstoffe aus einer Gruppe umfassend Cannabisprodukte, wie z.B. Marihuana, Haschisch und/oder Cannabinol, Kokain, wie z.B. Benzoyllecgonine, Crack und/oder Crystal, Opiate, wie z.B. Morphium, Acetylmorphin, Heroin, Codein, Propoxyphene und/oder Fentanyl, Nikotin, Kotinin, d-Lysergsäurediethylamid (LSD), Psilocybin und Psilocin, Mescaline und Peyote, Methadon oder Methadonmetabolite, oder eine Designerdroge, wie z.B. Amphetamine (MDA, Dimethoxybromamphetamin), Methamphetamine (Ecstasy, MDMA), Phencyclidin (Engelsstaub), γ -Hydroxybuttersäure (Liquid Ecstasy), Antiepileptika, wie z.B. Phenytoin, ausgewählt werden.

10

8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Dopingmittel aus einer Gruppe umfassend Anabolika, wie z.B. Testosteron und seine Derivate, Somatotropin, Ephedrin-Derivate, Analeptika, wie z.B. Strychnin, Amphetamin-Derivate, Analgetika, Antitussiva, Mittel zur Steigerung der Sauerstofftransportkapazität und der Sauerstoffverfügbarkeit für die Skelettmuskulatur, wie z.B. Erythropoietin und/oder Diuretika, ausgewählt werden.

15

9. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Arzneimittel Analgetika oder Psychopharmaka aus einer Gruppe umfassend, Neuroleptika, wie z.B. Phenothiazin, Butyrophenone und/oder Thioxanthene, Antidepressiva, wie z.B. MAO (Monoaminoxidase)-Hemmer, Imipramin, Desipramin, Amitryptilin, etc., Tranquilizer, wie z. B. Benzodiazepine (Diazepam), Barbiturate und/oder Psychoanaleptika, Stimulantien, wie z.B. Phenylethylamin, Antiepileptika und/oder Hypnotika, ausgewählt werden.

20

10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Antikörper, gebildet als Reaktion auf virale, viroide, bakterielle, mykotische, parasitäre bzw. auf Prionen basierende Infektionen und/oder gebildet infolge von Immunisierungen (Impfung beim Menschen oder Tier bzw. polyklonale Antikörperherstellung bei Tieren) und/oder gebildet infolge von Autoimmunkrankheiten oder allergischen Reaktionen nachgewiesen werden.

25

11. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Hormone, wie z.B. HCG (human chorion Gonadotropin), nachgewiesen werden.

30

12. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Proteine Tumormarker aus einer Gruppe umfassend squamous cell carcinoma antigen (SCC), Thyreoglobulin (Tg), Steroidhormonrezeptoren, Prostata-spezifisches Antigen (PSA), Neuronen-spezifische Enola-

35

se (NSE), Carcinoembryonales Antigen (CEA), Alpha-Fetoprotein (AFP), CYFRA 21-1, CA 125, 19-9, 72-4, 15-3, MCA (Mucine-like cancer associated antigen) und/oder humanes Calcitonin (hCT), nachgewiesen werden.

5 13. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Intoxikationen verursacht durch Toxine aus einer Gruppe umfassend Botulinumtoxin, Toxine aus Pilzen, Bakterien, Algen, Pflanzen und ihren Bestandteilen, Lebensmitteln und/oder Toxine künstlichen Ursprungs, z.B. Kampfgifte, und/oder Schwermetalle nachgewiesen werden.

10 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt aus einer biologischen Probe menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, wie z.B. Blut, Plasma, Serum, Urin, Speichel, Schweiß, Sperma und/oder Blätter, nachgewiesen wird.

15 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt von einer Oberfläche eines Gegenstandes oder eines menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Körpers nachgewiesen wird.

20 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt aus dem Boden, aus Wasser oder der Luft nachgewiesen wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Konzentration des zumindest einen Analyten in der Probe ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,01 ng/ml, vorzugsweise 0,1 ng/ml, insbesondere 0,2 ng/ml
25 und einer oberen Grenze von 1000 ng/ml, vorzugsweise 200 ng/ml, insbesondere 100 ng/ml nachgewiesen wird.

18. Vorrichtung zum Nachweis zumindest eines Analyten, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17, mit einem oder mehreren kapillarfähigen Materialien, auf denen zumindest eine Startzone und eine angrenzende Zone bestehend
30 aus einem oder mehreren Feldern in dem oder denen zumindest ein immobilisiertes Reagens angeordnet ist, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem oder den kapillarfähigen Materialien (3) zumindest ein analytspezifischer Bindungspartner (14), an welchen zumindest eine Substanz konjugiert ist, temporär immobilisiert ist.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß freie unspezifische Bindungsstellen auf dem einen oder mehreren kapillarfähigen Materialien (3) durch Reagenzien ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Proteine, wie z. B. BSA, Milchpulver, Casein, Gelatine, fettfreies Milchpulver, Kälberserum, kommerzielle Blockungsreagenzien wie Blotto oder Superblock (Fa. Pierce), und/oder Detergenzien, wie z.B. Tween-20, Triton X-100, Nonidet P-40 und/oder Chaps, blockiert sind.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz aus einer Gruppe umfassend alkalische Phosphatase, Peroxidase z.B. vom Meerrettich, β -Galactosidase, Streptavidin/Avidin, Protein A oder zu hochaffinen spezifischen Bindungen befähigte Moleküle und/oder einem katalytisch wirkenden Stoff, ausgewählt ist.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Zone (6) aus zumindest einem Feld ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Analysefelder (10), Kontrollfelder (11), Lauffelder (9), Farbstofffelder (12) und/oder Konjugatfelder (8), besteht.
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß sich zumindest ein Feld mit Farbstoffkomponenten bzw. deren Vorstufen zwischen der Startzone und dem zumindest einen Analyse- und /oder Kontrollfeld (10, 11) befindet.
23. Vorrichtung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Farbstoffkomponenten bzw. deren Vorstufen aus einer Gruppe, umfassend Tyramin und dessen Derivate, X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid), S-Gal (3,4 Cyclohexenoesculetin- β -D-Galactopyranosid), ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid), CPRG (Chlorophenol red- β -D-Galactopyranosid), Bluogal (5-Brom-3-Indolyl- β -D-Galactosid), MUGal (4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactopyranosid), NBT (Nitroblue Tetrazolium Chlorid), BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat), PNPP (p-Nitrophenyl Phosphat), OPD (o-Phenylenediamine), ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenz-thiazoline Sulfonic Acid), DAB (3,3-Diaminobenzidine), TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine), Phenazinmethosulfat, Kaliumferrocyanid, Kaliumferricyanid, Ferric Ammoniumcitrat, VectorBlackTM, Chemilumineszenzfarbstoffe, wie z.B. Galacton-Star Substrat, Lumi-PhosTM plus, LuciGLOTM, DuoLuXTM, Lumigen PS-3, chemiluminescent HRP (horseradishperoxidase) Substrat, 2 Component System from BioFXTM, und/oder Lumi-Gal 530 und/oder Fluoreszenzfarbstoffe, z.B. 3-Carboxyumbelliferyl- β -D-Galactopyranosid (CUG) und/oder MUP (4-Methylumbelliferyl-Phosphat), ausgewählt sind.

24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Farbstoffkomponenten und deren Vorstufen, jeweils in Gew-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 %, insbesondere 1 %, vorzugsweise 2 %, und einer oberen Grenze von 20 %, insbesondere 10 %, vorzugsweise 4 %, ausgewählt ist.

5

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem zumindest einen Farbstofffeld (12) Stoffe, ausgewählt aus einer Gruppe umfassend, Bovines Serum Albumin (BSA), Casein, Gelatine, Maltodextrin (Maltrin), Milchpulver und/oder das Reagens und/oder Bestandteile des Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 56 vorhanden sind.

10

26. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Stoffe, jeweils in Gew-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 %, insbesondere 1 %, vorzugsweise 5 %, und einer oberen Grenze von 50 %, insbesondere 30 %, vorzugsweise 10 %, ausgewählt ist.

15

27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß im Kontrollfeld (11) zumindest ein spezifischer Bindungspartner (14) für die zumindest eine Substanz immobilisiert ist.

20

28. Vorrichtung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des substanzspezifischen Bindungspartners aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,5 ng/ml, insbesondere 1 ng/ml, vorzugsweise 2 ng/ml, und einer oberen Grenze von 5 mg/ml, insbesondere 3 mg/ml, vorzugsweise 1 mg/ml, ausgewählt ist.

25

29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß das Kontrollfeld distal vom Analysefeld in bezug auf die Startzone angeordnet ist.

30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß im Analysefeld (10) eine vorbestimmbare Menge des zumindest einen Analyten (13) immobilisiert ist.

30

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt (13) aus einer Gruppe nach einem der Ansprüche 5 bis 13 ausgewählt ist.

35

32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge des zumindest einen Analyten (13) aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,5 ng/ml, insbesondere 1 ng/ml, vorzugsweise 2 ng/ml, und einer oberen Grenze von 5 mg/ml, insbesondere 3 mg/ml, vorzugsweise 1 mg/ml, ausgewählt ist.

5

33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß der zumindest eine Analyt (13) in einer Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen vorliegt, wobei jeweils eine Konzentration der Verdünnungsreihe in einem vorbestimmbaren Analysefeld (10) vorliegt.

10

34. Vorrichtung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des zumindest einen Analyten (13) in der Verdünnungsreihe mit einem Faktor, ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 1, insbesondere 2, und einer oberen Grenze von 100, insbesondere 10, vorzugsweise mit einem Faktor 5 abnimmt.

15

35. Reagens zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagens aus zumindest einem Alkohol und/oder Keton und/oder zumindest einer Pufferlösung und/oder zumindest einem Detergens und/oder zumindest einem Konservierungsmittel besteht.

20

36. Reagens nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagens mit zumindest einem analytspezifischen Bindungspartner (14) hergestellt ist.

25

37. Reagens nach einem der Ansprüche 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagens mit einer oder mehreren Farbstoffkomponenten oder deren Vorstufen hergestellt ist.

30

38. Reagens nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß die eine oder mehreren Farbstoffkomponenten bzw. deren Vorstufen aus einer Gruppe, umfassend Tyramin und dessen Derivate, X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid), S-Gal (3,4 Cyclohexenoes-culetin- β -D-Galactopyranosid), ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid), CPRG (Chlorophenol red- β -D-Galactopyranosid), Bluogal (5-Brom-3-Indolyl- β -D-Galactosid), MUGal (4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactopyranosid), NBT (Nitroblue Tetrazolium Chlorid), BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat), PNPP (p-Nitrophenyl Phosphat), OPD (o-Phenylenediamine), ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenz-thiazoline Sulfonic Acid), DAB (3,3-Diaminobenzidine), TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine), Phenazinmethosulfat, Kaliumfer-

35

rocyanid, Kaliumferricyanid, Ferric Ammoniumcitrat, VectorBlack™, Chemilumineszenzfarbstoffe, wie z.B. Galacton-Star Substrat, Lumi-Phos™ plus, LuciGLO™, DuoLuX™, Lumigen PS-3, chemiluminescent HRP (horseradishperoxidase) Substrat, 2 Component System from BioFX™, und/oder Lumi-Gal 530 und/oder Fluoreszenzfarbstoffe, z.B. 3-Carboxyumbelliferyl-β-D-Galactopyranosid (CUG) und/oder MUP (4-Methylumbelliferyl-Phosphat), ausgewählt sind.

39. Reagens nach einem der Ansprüche 37 oder 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Farbstoffkomponenten, jeweils in Gew.-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,01 %, insbesondere 0,1 %, vorzugsweise 1 %, und einer oberen Grenze von 20 %, insbesondere 10 %, vorzugsweise 4 %, ausgewählt ist.

40. Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein Stoff ausgewählt aus einer Gruppe umfassend, Bovines Serum Albumin (BSA), Casein, Gelatine, Kälberserum, Maltodextrin (Maltrin), Milchpulver und/oder kommerzielle Blockungsreagenzien, wie z.B. Blotto oder Superblock, enthalten ist.

41. Reagens nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Substanzen, jeweils in Gew.-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1%, insbesondere 1 %, vorzugsweise 5 %, und einer oberen Grenze von 30 %, insbesondere 20 %, vorzugsweise 10 %, ausgewählt ist.

42. Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 41, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagens aus einwertigen Alkoholen, ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol und/oder Pentanol, herstellbar ist.

43. Reagens nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der einwertigen Alkohole, jeweils in Gew.-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,5 %, insbesondere 5 %, vorzugsweise 10 %, und einer oberen Grenze von 40 %, insbesondere 30 %, vorzugsweise 20 %, ausgewählt ist.

44. Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 43, dadurch gekennzeichnet, daß mehrwertige Alkohole, wie z.B. Ethylenglykol, Polyethylenglykol und/oder Glycerin zugefügt sind.

45. Reagens nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der mehrwertigen Alkohole, jeweils in Gew-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 %, insbesondere 2 %, vorzugsweise 5 %, und einer oberen Grenze von 20 %, insbesondere 15 %, vorzugsweise 10 %, ausgewählt ist.

5

46. Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 45, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagens aus Ketonen mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen, wie z.B. Propanon, Butanon, Pentanon, Hexanon, Heptanon und/oder Octanon, herstellbar ist.

10

47. Reagens nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Ketone, jeweils in Gew-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 %, insbesondere 2 %, vorzugsweise 5 %, und einer oberen Grenze von 20 %, insbesondere 15 %, vorzugsweise 10 %, ausgewählt ist.

15

48. Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 47, dadurch gekennzeichnet, daß als weiterer Bestandteil zumindest eine Pufferlösung, ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Citratpuffer, Acetatpuffer, Maleatpuffer, Phosphatpuffer, Collidinpuffer, Triethanolamin-HCl-EDTA-Puffer, Trispuffer, Ammediolpuffer, Glycinpuffer, Diethanolaminpuffer oder Tris-Borsäure-EDTA-Puffer oder Puffer nach Good, N. E. et al. (1966) Biochemistry 5, 467 enthalten ist.

20

49. Reagens nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Pufferlösung ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 5,5, vorzugsweise 6,0 und insbesondere 6,5 hat und mit einer oberen Grenze von 9,5, vorzugsweise 9,0, insbesondere 8,5, beträgt.

25

50. Reagens nach Anspruch 48 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der zumindest einen Pufferlösung, jeweils in Gew-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 %, insbesondere 1 %, vorzugsweise 2 %, und einer oberen Grenze von 20 %, insbesondere 15 %, vorzugsweise 10 %, ausgewählt ist.

30

51. Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 50, dadurch gekennzeichnet, daß als Detergens zumindest ein Vertreter ausgewählt aus einer Gruppe umfassend (Octylphenoxy)-polyethoxyethanol, Alkylphenolpolyglycolether, Tween 20, Natriumdeoxycholat, Nonidet P-40 (Igepal CA-630), Triton X-100, Cholic acid, Deoxycholic acid und/oder Zwittergent®

35

zugefügt ist.

52. Reagens nach Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des zumindest einen Detergens, jeweils in Gew-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von
5 0,001 %, insbesondere 0,005 %, vorzugsweise 0,01 %, und einer oberen Grenze von 1 %, insbesondere 0,5 %, vorzugsweise 0,2 %, ausgewählt ist.

53. Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein Stoff ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Natriumsalze, Kaliumsalze, Phosphatsalze, Magnesium- und/oder Mangansalze, Bovines Serum Albumin (BSA), Casein, Gelatine, Maltodextrin, Kälberserum und/oder Milchpulver, zugesetzt sind.
10

54. Reagens nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Stoffe, jeweils in Gew-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,001 %, insbesondere 0,1 %, vorzugsweise 1 %, und einer oberen Grenze von 30 %, insbesondere 20 %, vorzugsweise 10 %, ausgewählt ist.
15

55. Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 54, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein Konservierungsmittel, ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Natriumazid, Natriumbenzoat, Sorbinsäure, Pentachlorophenol, Sorbat und/oder Konservierungsmittel auf Quecksilber-Basis, zugesetzt ist.
20

56. Reagens nach Anspruch 55, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Konservierungsmittels, jeweils in Gew-%, aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von
25 0,01 %, insbesondere 0,05 %, vorzugsweise 0,1 %, und einer oberen Grenze von 5 %, insbesondere 3 %, vorzugsweise 1 %, ausgewählt ist.

57. Analysekit umfassend zumindest ein saugfähiges Material, ein Reagens zur Aufnahme zumindest eines Analyten (13) und eine Vorrichtung (1) aus kapillarfähigem Material, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 56 und die Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 18 bis 34 ausgebildet ist.
30

58. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 34 für den Nachweis zumindest eines Analyten.
35

59. Verwendung des Reagens nach einem der Ansprüche 35 bis 56 für den Nachweis
zumindest eines Analyten.

5 60. Verwendung des Analysekits nach Anspruch 57 für den Nachweis zumindest eines
Analyten.

10

15

20

25

30

35

Fig.1

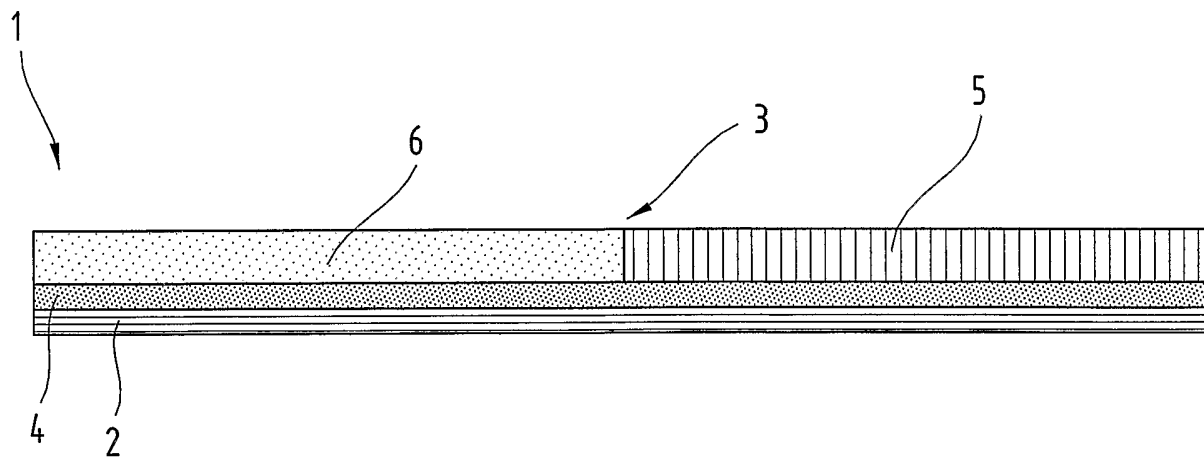


Fig.2

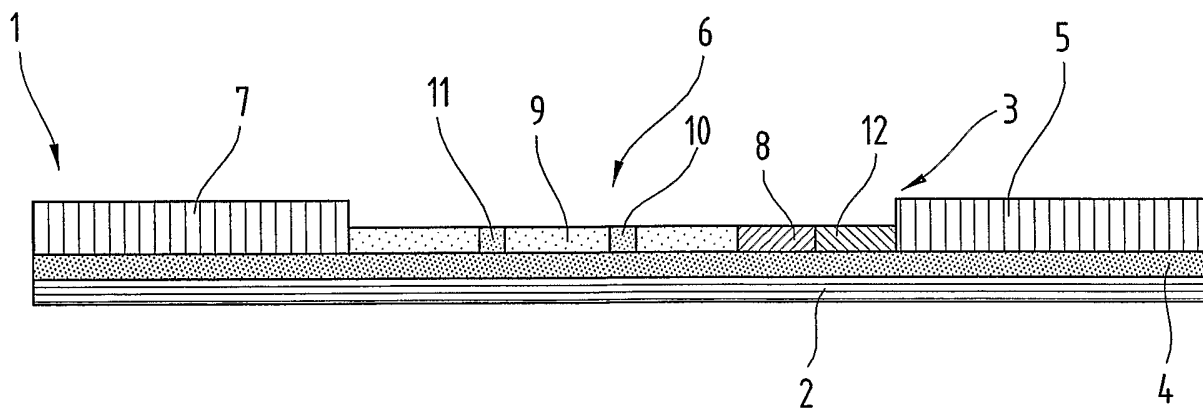


Fig.3

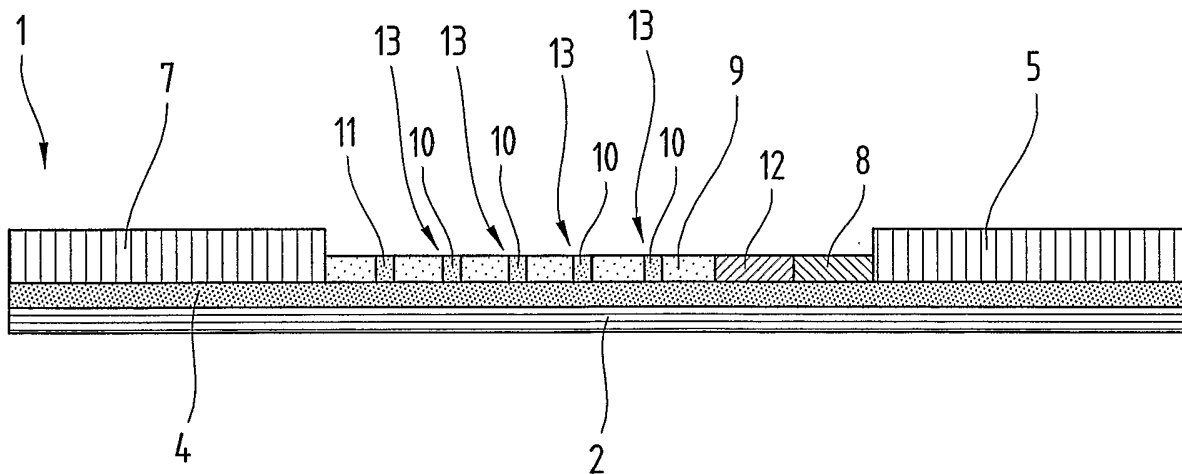


Fig.4

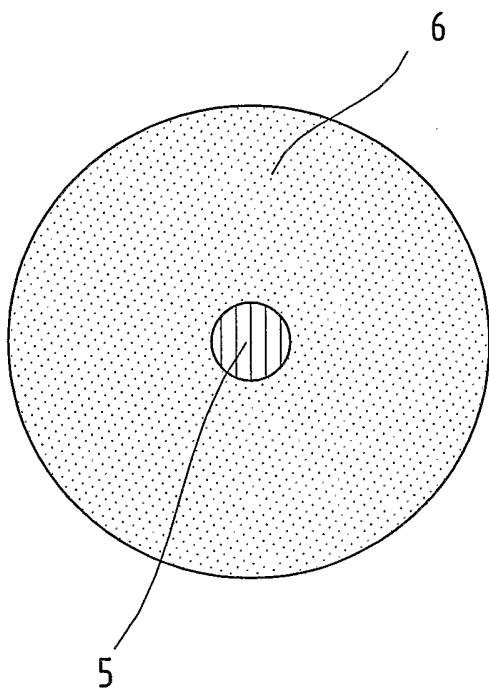


Fig.5

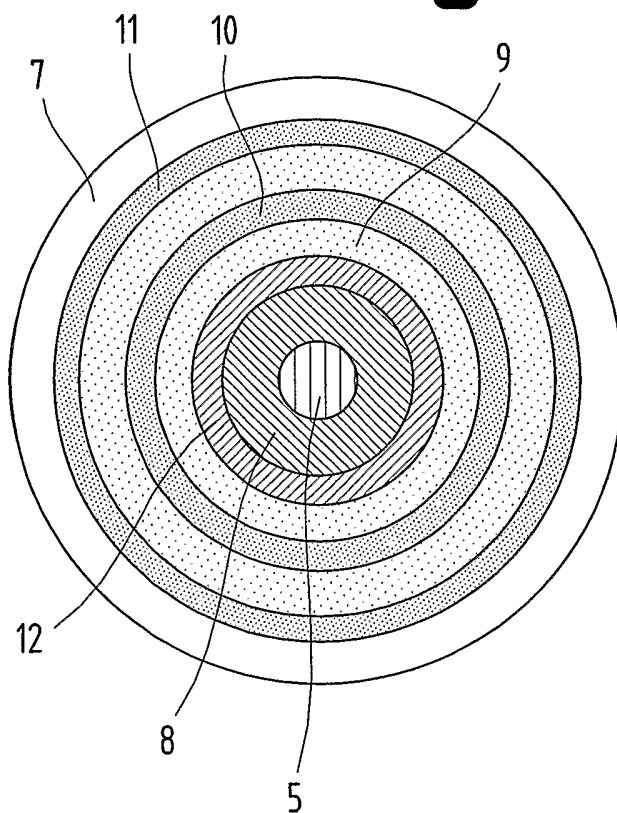


Fig.6

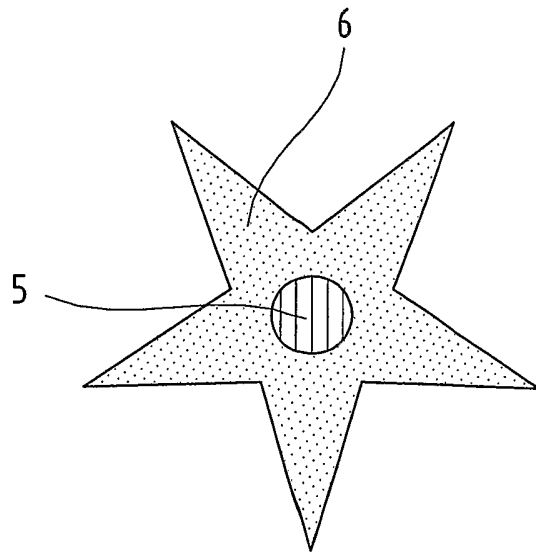


Fig.7

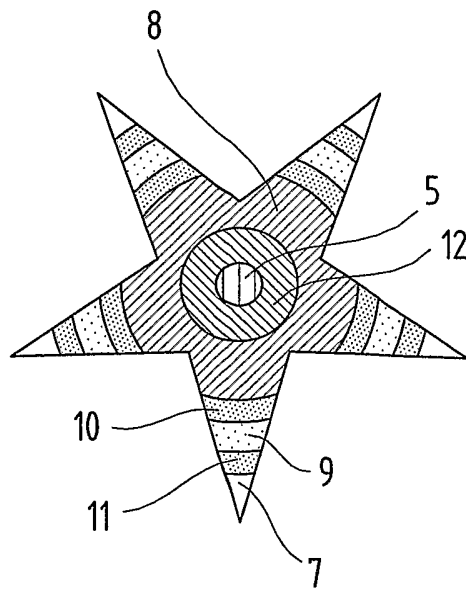


Fig.8

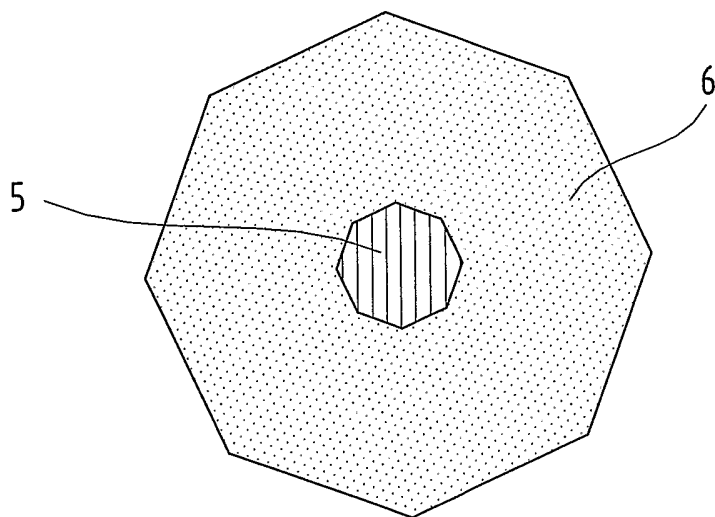


Fig.9

